FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GENERALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE N° 1

RECHERCHE
SUR
LA BIOCHIMIE DE LA PHÉNYLALANINE

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le 1944

PAR

Raymond MICHEL
LICENCIÉ ÈS-SCIENCES
ASSISTANT DE CHIMIE BIOLOGIQUE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE
né le 14 mars 1914, à Marseille.

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE
Diplôme d'Etat

Examinateurs de la Thèse : MM. J. ROCHE, Professeur, *Président.*
NICLOUX, Professeur honoraire.
M. DESNUELLE, M. de conf. Fac. Sc. } *Assesseurs*
ARNOUX, Agrégé.

MAURICE DECLUME
IMPRIMEUR
LONS-LE-SAUNIER
1944

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GENERALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE N°

RECHERCHE
SUR
LA BIOCHIMIE DE LA PHÉNYLALANINE

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le 1944

PAR

Raymond MICHEL
LICENCIÉ ÈS-SCIENCES
ASSISTANT DE CHIMIE BIOLOGIQUE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE
né le 14 mars 1914, à Marseille.

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE
Diplôme d'Etat

Examinateurs de la Thèse : MM. J. ROCHE, Professeur, *Président.*
NICLOUX, Professeur honoraire.
M. DESNUELLE, M. de conf. Fac. Sc.
ARNOUX, Agrégé. — *Assesseurs*

MAURICE DECLUME
IMPRIMEUR
LONS-LE-SAUNIER
1944

Chargés de cours :

Clinique dermatologique ..... VIGNE
Hydrologie clinique et thérapeutique ..... PIERI

Agrégés en exercice :

MM. BERTHIER	MM. CHOSSON	MM. AUDIER
BALANSARD	DELPHAUT	DOR
BRAHIC	R. IMBERT.	RECORDIER
FIGARELLA	PAILLAS	SALMON
ARNOUX		

Chargés des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale ..... DERRIEN
Physiologie ..... DONNET
Physique ..... ROUX

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique ..... SALMON
Chimie minérale ..... ARNOUX
Chimie organique ..... DUMAZERT
Clinique de la tuberculose ..... BERTHIER
Clinique des maladies contagieuses ..... PERIOT
Clinique chirurgicale infantile ..... R. IMBERT
Clinique stomatologique ..... ACHARD
Clinique gynécologique ..... FIGARELLA
Médecine opératoire ..... DOR
Microbiologie (Pharmacie) ..... BOYER
Neuro-Chirurgie ..... ARNAUD
Obstétrique ..... CHOSSON
Pharmacodynamie (Pharmacie) ..... DELPHAUT
Psychiatrie ..... ALLIEZ
Toxicologie ..... GUILLOT

A LA MÉMOIRE DE MA GRAND'MÈRE

A MES GRANDS PARENTS

A MES BEAUX PARENTS

A la mémoire de Xavier HAHN

MORT POUR LA FRANCE

A Louis GAY

PHARMACIEN-CHIMISTE DE LA MARINE

ET A TOUS MES AMIS

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE
DE CHIMIE BIOLOGIQUE

EN PARTICULIER A Mademoiselle Marthe MOUTTE

en souvenir de notre amicale collaboration.

PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION.

La phénylalanine ou acide α-amino, γ-phényl-propionique, $C_6H_5—CH_2—CH(NH_2)COOH$, a été découverte par SCHULZE et BARBIERI [43] en 1881 dans les bourgeons de *Lupinus luteus*, sous forme d'un composé cristallisé en fines aiguilles blanches fondant à 250° C environ et donnant par oxydation du carbonate de phényléthylamine. Cependant, la constitution de la phénylalanine ne fut parfaitement connue qu'après la synthèse de ce corps. Celle-ci consiste à obtenir dans un premier temps, par condensation de l'acide cyanhydrique à l'aldéhyde phénylacétique, $C_6H_5—CH_2—CHO$, le nitrile phényllactique, $C_6H_5—CHOH—CN$, puis, dans un deuxième temps, à chauffer le nitrile de l'acide α-phényllactique avec une solution alcoolique d'ammoniaque. Il se forme ainsi l'acide α-amino, γ-phénylpropionique, qui possède des propriétés identiques au corps isolé de *Lupinus luteus*.

La formule, $C_6H_5—CH_2—CH(NH_2)COOH$, traduit l'existence d'un carbone asymétrique, ce qui implique l'existence d'isomères optiques. En effet, si les produits obtenus par synthèse sont inactifs sur la lumière polarisée, il n'en est pas de même des composés naturels, la plupart du temps lévogyres ; aussi insisterons-nous

plus spécialement sur le composé gauche dans l'étude des propriétés de la phénylalanine.

I. — Préparations à partir de germes de *Lupinus luteus*.

La phénylalanine a été isolée à partir des hydrolysats des protéines les plus diverses. Elle a aussi été retirée des bourgeons ou des graines qui renferment à l'état libre de grandes quantités de *l*-phénylalanine pure. On la sépare de l'acide amino-valérianique à l'état de sel de cuivre et de la leucine par précipitation au nitrate mercurique en milieu carbonaté ou bien par l'acide phosphotungstique. On libère la phénylalanine que l'on purifie par distillation de son ester méthylique, selon la technique de Fischer [13] dont nous indiquerons le détail plus bas.

On peut aussi extraire les germes par l'alcool chaud à 90-95°. La solution alcoolique est reprise par de l'eau et traitée au sous-acétate de plomb. Le plomb est ensuite précipité et séparé sous forme de sulfure. Le filtrat est concentré et le précipité obtenu recristallisé dans l'alcool ammoniacal. Il reste cependant avec la phénylalanine de la valine et une petite fraction d'asparagine ; on la purifie par la différence de solubilité des sels de cuivre.

II. — Préparations à partir des hydrolysats de protéines.

1°) En principe, les protéines sont hydrolysées par de l'acide sulfurique ou chlorhydrique au bain de sable pendant 24 heures. Les acides aminés libérés sont transformés en esters éthyliques puis distillés. On recueille dans la dernière fraction du distillat l'ester de la phé-

nylalanine qui est ensuite saponifié et l'acide aminé est alors recristallisé.

Cette technique d'isolement, dûe à E. Fischer [13], sera exposée en détails avec l'étude des procédés de dosage.

2°) Plus récemment Bergmann et Niemann [4] ont isolé la phénylalanine à partir des hydrolysats protéiques par précipitation fractionnée au moyen de l'acide picrique.

Ils commencent par séparer la tyrosine cristallisée de l'hydrolysat, puis ils traitent celui-ci par du butanol. Le butanol est ensuite distillé sous vide et les acides aminés dissous dans le minimum d'eau. Après avoir abandonné une nuit à 6° C, la *l*-leucine cristallise. Le filtrat est alors précipité par du sulfate mercurique. On filtre et le produit de cette nouvelle filtration est traité par la baryte pour en éliminer l'acide sulfurique. La solution exempte de sels est concentrée à un petit volume (100 cm^3 lorsque 100 gr. de protéine sont employés). La leucine impure insoluble est séparée. Après cette séparation, le filtrat est chauffé avec un excès d'hydroxyde de cuivre. Après refroidissement on filtre, le précipité est remis en suspension dans l'eau puis décomposé par l'hydrogène sulfuré. Cette solution est à nouveau concentrée à un faible volume et fractionnée au moyen d'acide picrique. Le picrate de baryte et les sels inorganiques sont éliminés ; une nouvelle quantité d'acide picrique est ajoutée jusqu'à ce que le picrate de phénylalanine ait complètement reprécipité.

Le précipité cristallin est recristallisé deux fois dans l'eau chaude (N théorique = 15,9 p. 100. P. F. = 200° C).

III. — Propriétés physiques.

La phénylalanine obtenue par refroidissement à partir de solutions chaudes et concentrées se présente en

feuilles brillantes. Par recristallisation de ses solutions aqueuses diluées on obtient des aiguilles fines et blanches.

La phénylalanine est assez peu soluble dans l'eau froide ; une partie dans 32,4 parties d'eau à 25° C ; elle est plus soluble à chaud.

Elle est très peu soluble dans les solvants organiques usuels : alcool éthylique, éther, etc..., à peu près insoluble dans l'alcool méthylique.

Par chauffage une partie se sublime ; elle fond à 278° C avec décomposition en donnant une substance légèrement amère (point de fusion après correction 283° C).

La phénylalanine naturelle extraite de *Lupinus luteus* est lévogyre $[\alpha]_D^{20° c} = -35°1$.

IV. — Propriétés chimiques.

a. Dégradation par chauffage. — La dégradation de la phénylalanine par chauffage à sec est caractéristique. Si dans un tube à essai on chauffe quelques centigrammes de phénylalanine on constate qu'une faible partie se sublime sans décomposition, le reste fond puis se décompose partiellement en formant du gaz carbonique et de l'eau. Le résidu est constitué par un liquide jaune cristallisant par refroidissement ; les cristaux sont constitués par de la phénylactimide. En outre un composé volatil — de la phényléthylamine — se condense en gouttelettes huileuses sur les parois du tube qui, en se combinant avec le gaz carbonique dû à la décomposition, donne des cristaux de carbonate de phényléthylamine. Ce corps prend également naissance en distillant la phénylalanine avec de la chaux.

b. Oxydation. — L'oxydation ménagée à chaud effectuée par le mélange sulfochromique dégage de la phénylacétaldéhyde, d'odeur caractéristique, que des traces

suffisent à déceler. Si le chauffage en milieu oxydant est poussé il se forme de l'acide benzoïque qui précipite en flocons caractéristiques.

Les hypochlorites alcalins oxydent la phénylalanine en donnant un dérivé ammoniacal de la phénylacétaldéhyde.

Par oxydation électrolytique la phénylalanine est détruite, il apparaît aux bornes du gaz carbonique et de l'ammoniaque.

c. Réactions dûes a l'existence du cycle benzénique. — 1°) L'eau oxygénée en présence de sulfate ferreux oxyde le cycle de la phénylalanine pour donner de la tyrosine. La mobilité de l'hydrogène situé en para par rapport à la chaîne d'alanine rend cette oxydation assez facile ; d'ailleurs ce mécanisme de transformation de la phénylalanine en tyrosine se produit souvent par voie biologique.

C'est ainsi que par la perfusion d'un foie de chien par du sang additionné de phénylalanine on peut provoquer la formation de *l*-tyrosine. Elle explique que les protéines des tissus animaux renferment de la tyrosine alors que la phénylalanine est le seul acide aminé indispensable.

Tout récemment Moss et Schoenheimer [33] ayant ajouté à la caséine, donnée comme alimentation à des rats, de la *dl*-deutérophénylalanine, trouvent qu'il se forme de la deutérotyrosine provenant vraisemblablement de la deutérophénylalanine.

2°) La phénylalanine chauffée avec de l'acide nitrique fort donne, par suite de la formation d'un composé nitré sur le noyau, une coloration jaune ; cette nitration constitue la réaction xanthoprotéique.

3°) Par action du nitrite de sodium et de l'acide chlorhydrique concentré sur diverses protéines (albumine d'œuf, kératines), il apparaît de l'acide cinnamique. Jochem [21] attribue cette formation à la présence de

la phénylalanine dans les protéines ; en effet l'acide cinnamique aurait pris naissance à partir de la phénylalanine par l'intermédiaire de l'acide phénylchloropropionique.

d. Réactions de précipitation. — Le nitrate mercurique précipite la phénylalanine, mais la présence de grandes quantités de leucine empêche cette précipitation.

La phénylalanine est précipitée par un grand excès d'acide phosphotungstique. La précipitation phosphotungstique dépend également de la concentration de la phénylalanine. En effet une solution à 0,125 p. 100 n'est pas précipitée, une solution à 0,25 p. 100 après 10 minutes environ, et une solution à 1 p. 100 immédiatement. Une solution à 10 p. 100 est précipitée presque totalement par une solution de 4 parties d'acide phosphotungstique pour une partie d'eau. La leucine et l'acide aminovalérianique ne gênent pas la précipitation de la phénylalanine si la concentration en ce dernier acide aminé est grande, par contre elles l'empêchent pour une concentration de 0,5 p. 100.

e. Réactions colorées et d'identification. — 1°) Avec la ninhydrine la phénylalanine donne une coloration bleue ; cette coloration assez stable a été utilisée dans un procédé de dosage, mais d'autres acides aminés fournissent également des colorations diverses avec ce réactif et le dosage est difficilement réalisable dans des mélanges.

2°) La phénylalanine chauffée au bain-marie bouillant avec de l'aldéhyde méthylique en milieu chlorhydrique concentré donne de l'acide tétrahydroquinoléine-3-carbonique.

3°) F. Miller et R. E. Lyons [31] ont découvert que la phénylalanine avec de l'hypochlorite de sodium à la concentration de 0,2 à 0,9 p. 100 dans 0,003 à 0,25 p. 100 Na_2O développe une turbidité spécifique.

4°) Fosse, de Graëve et Thomas [16] ont obtenu à partir de la phénylalanine l'acide xanthyluréido-α-phénylpropionique dont les cristaux caractéristiques sont formés d'aiguilles groupées ; l'analyse élémentaire de ces cristaux constitue un moyen précis d'identification.

5°) Un dégagement de NH_3 et de CO_2 se produit par l'action sur divers acides aminés — et en particulier sur la phénylalanine — de l'acide ascorbique en présence de fer et d'oxygène. Il se forme un aldéhyde ayant un atome de carbone de moins que l'acide aminé réagissant. La désamination par l'acide ascorbique est augmentée en présence de cuivre et en lumière ultraviolette. Les aldéhydes dérivées isolées par Abderhalden [1] ont été utilisées pour identifier les amino-acides.

6°) R. Kappeler-Adler [22] signale une réaction colorée de la phénylalanine permettant, outre la caractérisation, le dosage de cet acide aminé. Nous développerons plus spécialement l'étude de cette réaction étant donné son intérêt analytique particulier.

Le principe en est le suivant : la phénylalanine est nitrée par le nitrate de potassium en milieu sulfurique. Le produit de la nitration, réduit ensuite par l'hydroxylamine et l'ammoniaque, développe une intense coloration bleu violacée.

Kappeler-Adler pouvait penser tout d'abord que le réactif nitrant commençait par oxyder la phénylalanine en acide benzoïque, puis nitrait ce dernier en acide dinitrobenzoïque symétrique lequel par réduction avec le sulfhydrate d'ammonium ou le chlorhydrate d'hydroxylamine et d'ammoniaque devait conduire à des composés rougeâtres. Comme il apparaît, au contraire, une coloration bleue violacée, Kappeler-Adler fut amenée à considérer qu'il devait donc se former un dérivé différent de celui obtenu par nitration puis réduction de l'acide benzoïque.

Selon Mörner [32] la nitration de la phénylalanine donne de l'acide *p*-nitrobenzoïque et ne conduit en

aucun cas à l'obtention de l'acide benzoïque ; en fait l'application de la réaction à un échantillon de l'acide *p*-nitrobenzoïque pur fournit une coloration bleu violacée. Aussi, KAPPELER-ADLER admet-elle que c'est ce corps qui se forme lors de l'action de l'acide nitrique concentré sur la phénylalanine. La constitution de ce pigment violet est encore mal définie. KAPPELER-ADLER le considère comme constitué par le sel ammoniacal de l'acide *o*-diaci-dihydro-dinitrobenzoïque en se basant sur les travaux de MEISENHEIMER et de ses collaborateurs [29, 30] qui ont montré que par réduction ménagée de l'*o*- et du *p*-dinitrobenzène avec l'hydroxylamine en présence d'un excès d'alcali il se produisait des solutions fortement colorées de corps appartenant au groupe des diacidinitrobenzènes.

En effet l'*o*-dinitrobenzène réduit par le chlorhydrate d'hydroxylamine en milieu alcalin permet à MEISENHEIMER et PATZIG [30] d'obtenir un sel disodique brun foncé, soluble dans l'eau en donnant une coloration bleue à laquelle ils assignent la composition $C_6H_4N_2O_4Na_2$. Ils supposent que l'*o*-dinitrobenzène comme cela se produit pour trois doubles liaisons conjuguées, fixerait de l'hydrogène ou un métal en position 1,6. Cependant le *p*-dinitrobenzène réduit par l'hydroxylamine en présence de potasse donne un sel rouge auquel ces auteurs donnent une formule analogue.

Se basant sur ces résultats KAPPELER-ADLER estime que par nitration de la phénylalanine, comme de l'acide *p*-nitrobenzoïque il se formerait d'abord l'acide *o*-dinitrobenzoïque lequel par réduction ménagée au moyen d'hydroxylamine en présence d'ammoniaque fournirait le sel d'ammonium bleu de l'acide *o*-diaci-dihydro-dinitrobenzoïque.

La solution colorée traitée ensuite par de l'acide chlorhydrique développe, ainsi que l'a signalé MEISENHEIMER [28], une coloration jaune citron constituée par le mélange des deux isomères de l'acide nitro-nitroso-

benzoïque. Toutefois, les recherches effectuées pour saisir l'un des deux isomères manquent encore et il n'a pas été possible jusqu'à présent de les synthétiser.

Kuhn et Weygand [25] ont repris par la suite les travaux de Meisenheimer et Patzig [30] dans le but d'étudier la structure des produits obtenus par réduction des *o*- et *p*-dinitrobenzènes. Ils ont d'ailleurs réussi à isoler les sels, à l'état cristallisé. L'acide ascorbique est utilisé comme agent de réduction de préférence à l'hydroxylamine parce qu'il agit à la température ordinaire et de façon rapide.

Ces auteurs ont constaté que de l'*o*-dinitrobenzène finement pulvérisé se dissout en quelques minutes, en donnant une coloration violette, dans une solution d'acide ascorbique en milieu carbonaté, sous atmosphère d'azote. L'acide acétique change la couleur en jaune orangé. Le pigment coloré extrait par l'acétate d'éthyle est recristallisé dans le benzène. Il présente un point de fusion de 76° C. et possède toutes les propriétés de l'*o*-nitrophénylhydroxylamine. Il se dissout dans l'eau en donnant une coloration jaune passant au violet par action d'une solution diluée de carbonate de soude par suite de la formation du sel monosodique de formule $HON—C_6H_4—NO_2Na$. Dans la soude concentrée la matière colorante se dissout en donnant une couleur rouge brun intense constituée par le sel disodique, lequel est hydrolysé par dilution en sel monosodique.

La réduction de l'*o*- $ON—C_6H_4—NO_2$ est plus facile que celle de l'*o*- $C_6H_4\ (NO_2)_2$; elle s'effectue en milieu acide tandis qu'elle s'opère en milieu alcalin dans le cas de ce dernier composé.

De même la *p*-nitrophénylhydroxylamine s'obtient à partir du *p*- $C_6H_4\ (NO_2)_2$ ou du *p*- $ON—C_6H_4—NO_2$. Elle se dissout dans le carbonate de soude dilué en donnant une solution rouge cerise passant au jaune brunâtre par la soude diluée.

Les nitrophénylhydroxylamines sont sensibles à l'air

et pâlissent après un certain temps avec dépôt de flocons, la réaction est d'ailleurs catalysée par des traces de métal. La dissolution dans le carbonate de soude dilué de l'*o*. nitrophénylhydroxylamine montre trois bandes d'absorption de maximum 587, 546 et 500 mμ.

Se basant sur ces résultats Kuhn et Desnuelle [24] pensent, qu'après réduction, par l'acide ascorbique en milieu alcalin des produits résultant de la nitration de la phénylalanine, il se forme un chromogène violet constitué par des nitrophénylhydroxylamines. C'est ce pigment coloré que Kappeler-Adler considérait comme constitué par des dérivés de l'acide *o*-diaci-dihydro-dinitrobenzoïque. Il est possible cependant que la réduction par l'hydroxylamine et par l'acide ascorbique conduise à des corps différents.

Par la suite, Block et Bolling [7], revenant à l'hypothèse de Kappeler-Adler, ont montré que le chromogène violet se formant en fin de réaction dérivait très probablement de l'acide *o*-diaci-dihydro-dinitrobenzoïque. En effet, la diaci 3-4 dihydro-dinitro-phénylalanine a été isolée des produits de la nitration ménagée de l'acide aminé et par ailleurs, toute une série de dérivés de l'*o*-dinitrobenzène porteurs d'une chaîne latérale carbonée plus ou moins longue, parmi lesquels l'*o*-dinitrophénylalanine et l'acide *o*-dinitrobenzoïque, donnent naissance par réduction à pH = 9,5 à des chromogènes violets du type *o*-quinoniques à bandes d'absorption de maximum $\lambda = 530 - 550$ mμ, tandis que les isomères *p*-conduisent à des pigments rouge cerise. En outre, la nitration de la phénylalanine produit approximativement la même intensité de coloration que celle donnée par une quantité équimoléculaire de 2.3 dinitrotoluène, mais elle est environ le quart de celle fournie par le 3.4 dinitrotoluène. Il apparaît ainsi que la position des groupements nitrés sur le cycle n'est pas indifférente à l'intensité du chromogène violet formé en fin d'opération.

D'autre part la nitration de la *p*-nitrophénylalanine

et de l'acide phénylacétique donne seulement environ le quart de la couleur produite par nitration d'une quantité équimoléculaire de phénylalanine alors que l'acide phénylpropionique n'en donne que le septième, l'acide *p*-nitrobenzoïque environ le sixième. Block et Bolling concluent en considérant que lors de la nitration puis réduction de la phénylalanine la teinte violette obtenue n'est dûe qu'en faibles proportions à l'acide *p*-nitrobenzoïque contrairement à la conception de Kappeler-Adler qui supposait que les dérivés de cet acide seul étaient responsables de la coloration.

Pour choisir entre les deux opinions et pour conclure de façon définitive sur la nature exacte du chromogène violet, de nouvelles recherches semblent nécessaires. Il y aurait, en effet, intérêt à étendre les observations de Kuhn et Weygand [25] à des homologues et isologues des dinitrobenzènes, corps sur lesquels a porté l'expérimentation de Block et Bolling [7] et parmi lesquels se trouvent la 3,4 dinitrophénylalanine et l'acide 3,4 dinitrobenzoïque, corps prenant naissance au cours du dosage de la phénylalanine.

Il demeure par ailleurs possible que la réduction par l'hydroxylamine (Kappeler-Adler, Block et Bolling) et par l'acide ascorbique (Kuhn et Desnuelle) conduise à des corps différents.

V. — Procédés de dosage.

A. Anciens procédés. — 1° *Dosage de* E. Fischer [13]. — Après avoir hydrolysé les protéines en milieu sulfurique ou chlorhydrique au bain de sable, les aminoacides libérés sont transformés en esters éthyliques. Ces composés sont alors distillables sous pression réduite. On en sépare soigneusement les différentes fractions de distillation. L'ester éthylique de la phénylalanine se trouve dans la quatrième fraction. Celle-ci, qui passe entre 100 - 180° C. sous une pression de 0,1 à 0,5 mm.

de mercure contient, outre l'ester de la phénylalanine, ceux de la sérine et des acides aspartique et glutamique. Ce dernier acide aminé manque d'ailleurs souvent parce qu'il est éliminé de l'hydrolysat sous forme de chlorhydrate insoluble en milieu chlorhydrique concentré.

Le mélange des esters est additionné de cinq fois son volume d'eau où l'ester de la phénylalanine — en présence de beaucoup de phénylalanine — précipite en gouttelettes donnant à la solution un aspect laiteux ; cependant la solution devient souvent limpide parce qu'en présence des esters des autres acides aminés celui de la phénylalanine devient soluble dans l'eau.

On agite ensuite avec un volume d'éther ; le phénylalanine-éthylester passe à peu près complètement dans l'éther ; les autres esters en petites quantités. Pour éliminer ces derniers on agite trois fois la solution éthérée avec le même volume d'eau. L'éther est alors distillé, on pèse le résidu et on le saponifie au bain-marie par de l'acide chlorhydrique concentré.

La phénylalanine est obtenue à partir de son chlorhydrate en traitant ce composé par une solution d'ammoniaque ou d'acétate de sodium ; après concentration et lessivage à l'eau froide pour entraîner le chlorure inorganique il reste la phénylalanine que l'on purifie en la recristallisant dans l'eau chaude. Le rendement est amélioré si on recristallise directement dans HCl concentré dans lequel il est pratiquement insoluble.

Pour séparer la phénylalanine on peut se servir du fait qu'elle est précipitable sous forme de chlorhydrate en introduisant de l'acide chlorhydrique dans une solution aqueuse concentrée des esters saponifiés de la quatrième fraction de distillation. Cependant si l'acide glutamique n'a pas été éliminé au préalable il faudra séparer le chlorhydrate de la phénylalanine de celui de l'acide glutamique ; cette opération est assez difficile à réaliser.

La méthode générale du dosage des acides aminés de

E. Fischer est délicate et comporte des causes d'erreur par défaut, elle exige en outre de grandes quantités de protéine ; aussi est-elle abandonnée aujourd'hui.

2° *Dosage de* G. Kollmann [23]. — Les acides aminés obtenus après hydrolyse acide des protéines sont oxydés par le bichromate de potassium en milieu sulfurique. Le reste d'alanine est oxydé complètement et de l'acide benzoïque prend naissance ; on l'extrait à l'éther, on le pèse après dessiccation. Le dosage s'effectue sur 15 à 20 g. de protéine.

B. Dosages colorimétriques. — 1°) *Méthode de* Kappeler-Adler [22]. — Kappeler-Adler a établi une méthode de dosage de la phénylalanine utilisant la réaction que nous avons étudiée en détails au cours de l'exposé des propriétés chimiques de cet aminoacide. Nous en rappellerons ici le principe : la phénylalanine est nitrée par le nitrate de potassium en milieu sulfurique concentré, le produit de la nitration réduit ensuite par l'hydroxylamine et l'ammoniaque développe une intense coloration bleu violacée.

La mesure de la coloration obtenue en fin d'opération a permis à Kappeler-Adler l'élaboration d'un procédé de dosage. Pour cela il a été nécessaire à cet auteur de préciser les conditions de nitration et de réduction. Il a préconisé le mode opératoire suivant :

1 à 4 mg. de phénylalanine, à l'état sec, sont placés dans un petit cristallisoir avec 2 cm^3 du mélange nitrant, contenant 10 g. de nitrate de potassium dans 100 cm^3 d'acide sulfurique concentré, et sont chauffés pendant 20 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, on traite avec précautions par un peu d'eau et on transvase quantitativement dans une éprouvette de 25 cm^3. On rince le cristallisoir avec une petite quantité d'eau et on réunit les eaux de lavage dans l'éprouvette de manière que le volume total soit de 5 cm^3 (eaux de lavage et mélange nitrant). On refroidit à la glace.

Après refroidissement on ajoute 5 cm³ d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine à 15 p. 100 en agitant fortement ; puis, en maintenant l'éprouvette dans la glace, on ajoute de l'ammoniaque. Il se développe une coloration violette à la surface de séparation. On mélange doucement en maintenant le milieu glacé ce qui provoque un abondant dégagement d'azote. On porte ensuite 5 minutes à 40° C. La solution se colore en violet, puis on porte à nouveau dans un bain d'eau glacée ; au bout de 15 minutes où la coloration atteint son maximum on colorimètre en comparant la coloration avec celle obtenue en traitant de la même manière 1 à 4 cm³, préalablement desséchés avant nitration, d'une solution étalon renfermant 0,100 g. de phénylalanine dans 100 cm³ d'eau ammoniacale.

Il est indispensable pour obtenir des résultats utilisables que la nitration soit conduite en milieu anhydre ; la réaction est encore sensible pour 1/10 de mg. de phénylalanine. La coloration reste stable pendant quelques heures et les lectures donnent les mêmes résultats après 15 minutes ou après 4 à 5 heures.

Kappeler-Adler [22] a appliqué cette technique de dosage à la détermination de la phénylalanine dans diverses protéines. Pour cela 1,5 à 3 g. de protéine sont hydrolysés par de l'acide sulfurique à 25 p. 100 pendant 20 heures au bain de sable. L'hydrolysat est porté à un volume total de 100 cm³. Le dosage direct de la phénylalanine sur cette solution n'étant pas possible, à cause des colorations parasites fournies par l'histidine et la tyrosine, l'élimination préalable de ces deux acides aminés est nécessaire. (Le tryptophane qui donnait aussi une coloration parasite est détruit au cours de l'hydrolyse acide).

Pour éliminer l'histidine et les bases hexoniques on verse goutte à goutte du réactif phosphotungstique à 10 p. 100 jusqu'à louche persistant ; on ajoute alors une goutte supplémentaire. Un précipité se forme ; on le

redissout au bain-marie puis on le laisse une nuit à la glacière. On filtre le lendemain, on lave le précipité avec de l'eau distillée contenant quelques gouttes d'acide sulfurique. On porte à 200 cm^3.

Sur une partie aliquote (20 cm^3 en général) on détruit la tyrosine par oxydation au moyen de permanganate N/10. On verse ce réactif goutte à goutte jusqu'à coloration rose persistante. On porte ensuite au bain-marie ; au cours de l'évaporation on ajoute encore une goutte de MnO_4K N/10. On concentre à nouveau au bain-marie jusqu'à consistance huileuse. Sur cette partie les opérations de nitration et de réduction sont conduites comme dans le cas des solutions pures et le pigment coloré obtenu est colorimétré comme il a été indiqué précédemment. Voici les résultats obtenus par Kappeler-Adler sur diverses protéines :

Caséine 5 p. 100, légumine 4,98 p. 100, édestine 3,92 p. 100, hémoglobine 5,34 p. 100, élastine 3,34 p. 100, zéine 5,03 p. 100, et pour la gélatine 1,15 p. 100.

2°) *Modifications apportées à la méthode de* Kappeler-Adler. — *a.* Technique de Kuhn et Desnuelle [24]. Ces auteurs ont apporté diverses modifications à la méthode décrite précédemment, mais s'ils en acceptent le principe, ils en contestent l'interprétation. Ils admettent, en effet, que la coloration obtenue en fin d'opération est dûe, non pas à des combinaisons nitroso-nitrées mais à des nitrophénylhydroxylamines. La teinte violette colorimétrée serait due à un mélange de sel monoalcalin de beaucoup de *p*- et de peu d'*o*-nitrophénylhydroxylamine.

Le mode opératoire préconisé est le suivant : un volume contenant 1 à 4 mg. de solution de phénylalanine est évaporé à sec et nitré comme l'indique Kappeler-Adler avec 2 cm^3 de réactif nitrant constitué par 10 g. de NO_3K dans 100 cm^3 de SO_4H_2 pur, pendant 20 minutes au bain-marie bouillant.

Les produits de la nitration sont ensuite entraînés avec un peu d'eau dans une fiole jaugée de 25 cm_3, puis

alcalinisés avec de l'ammoniaque concentrée. Après refroidissement, on ajoute 0,5 cm_3 de solution fraîchement préparée d'acide ascorbique à 1 p. 100 — ce qui correspond à 5 mg. d'acide ascorbique. — On complète au trait de jauge avec de l'ammoniaque concentrée, on attend 30 minutes puis on effectue la lecture au colorimètre en utilisant un filtre S_{53}.

En résumé, les modifications apportées par Kuhn et Desnuelle [24] reposent principalement sur l'agent de réduction ; ils utilisent l'acide ascorbique de préférence au chlorhydrate d'hydroxylamine. Alors que dans la méthode de Kappeler-Adler l'agent de réduction est ajouté en milieu acide, la réduction par l'acide ascorbique se fait après avoir alcalinisé par de l'ammoniaque les produits de la nitration. En outre, Kuhn et Desnuelle [24] mesurent l'intensité de la coloration avec un filtre sélectif S_{53}, ce qui constitue un important progrès sur l'application de la méthode originale.

b. Technique de Block et Bolling [6]. — Ces auteurs ont simplifié le mode opératoire relativement compliqué de la méthode décrite par Kappeler-Adler. L'application de la technique de dosage de la phénylalanine aux hydrolysats protéiques se heurtait à de nombreuses difficultés dans la méthode initiale. La présence de divers acides aminés donnant une coloration brune en prohibait l'utilisation directe ; aussi Kappeler-Adler en considère indispensable l'élimination préalable de certains, spécialement de la tyrosine et de l'histidine.

L'oxydation spécifique de la tyrosine par MnO_4K est délicate et ne porte sur ce seul aminoacide que dans des conditions très particulières ; par ailleurs l'élimination de l'histidine au moyen de l'acide phosphotungstique entraîne des pertes en phénylalanine.

La technique de Block et Bolling évite ces deux inconvénients en effectuant directement sur l'hydrolysat protéique l'ensemble des opérations et en terminant par une mesure colorimétrique en lumière filtrée $\lambda = 550$ mμ

ce qui permet d'éliminer la coloration parasite due à la présence de ces acides aminés.

Voici la technique proposée par les auteurs américains [5] : 300 mg. de protéine sont hydrolysés par 3 cm³ de SO_4H_2 8 N pendant 18 à 20 heures dans un matras à minéralisation de microkjeldahl chauffé au bain d'huile à 130° C. (quelques gouttes d'alcool caprylique sont ajoutés pour empêcher les mousses). L'hydrolysat est ensuite dilué avec quelques cm³ d'eau, décoloré par 50 à 100 mg. de noir animal puis filtré. Le précipité restant sur le filtre est lavé plusieurs fois avec de petites quantités d'eau chaude ; le filtrat est porté ensuite à un volume total de 20 cm³. Une partie aliquote de la solution contenant approximativement 2 mg. de phénylalanine est prélevée pour le dosage. Elle est évaporée au bain-marie jusqu'à consistance sirupeuse. Après « refroidissement léger » on ajoute, en agitant, 2 cm³ de solution d'acide sulfurique pur contenant 20 p. 100 de nitrate de potassium. La nitration est poursuivie en portant au bain-marie bouillant pendant 20 minutes. « A peine refroidi », le mélange nitré est transvasé quantitativement dans un ballon jaugé de 25 cm³, puis porté jusqu'à 9 cm³ par de l'eau distillée. Après avoir agité le contenu du ballon, la solution est refroidie par de l'eau glacée puis réduite par 2,5 cm³ de chlorhydrate d'hydroxylamine à 30 p. 100. Dans le mélange à 0° C, de l'ammoniaque concentrée est ajoutée jusqu'à un volume de 25 cm³. La solution, refroidie pendant une minute dans un bain de glace, est abandonnée ensuite à la température ordinaire pendant 30 minutes pour permettre à la coloration de se développer. Par ailleurs, une solution étalon renfermant 2 mg. de phénylalanine dans 2 cm³ d'eau additionnée de 1,8 cm³ d'acide sulfurique 2 N est traitée de la même manière. La coloration de l'étalon et celle de l'hydrolysat à déterminer sont mesurées au photomètre de Pulfrich en utilisant le filtre S_{55}.

Appliquant cette technique Jervis, Block, Bolling et Kanze [20] ont trouvé que l'intensité de la coloration développée est proportionnelle à la quantité de phénylalanine employée. D'autre part ces auteurs ont montré que la présence de tyrosine, tyrosine et glycine, ou un excès d'acides aminés comprenant tyrosine, glycine, acide glutamique, arginine et histidine, ou un hydrolysat de protéine ajouté à une quantité définie de phénylalanine n'en gênent pas sa détermination. L'emploi d'un filtre coloré à 560 mμ rend inutile l'élimination de la tyrosine et de l'histidine comme l'a décrit Kappeler-Adler.

Cependant Block, Jervis, Bolling et Webb [8] ont signalé des faits de nature à jeter un certain discrédit sur la valeur des résultats obtenus jusqu'ici dans l'utilisation de la méthode de Kappeler-Adler appliquée aux hydrolysats protéiques acides. En effet, la teneur en phénylalanine de la caséine, égale à 5,0 p. 100 selon Kappeler-Adler (hydrolyse sulfurique) serait, pour Block et ses collaborateurs, de 3,9 p. 100 après action de l'acide sulfurique 8 N, de 5,0 p. 100 après celle de l'acide chlorhydrique 8 N et 5,8 p. 100 dans les hydrolysats alcalins (soude 5 N). Tout se passerait donc comme si le traitement alcalin permettait seul d'obtenir des résultats corrects, la phénylalanine étant — au même titre que le tryptophane — détruite par les acides forts. Cette éventualité étant en contradiction avec l'opinion classique, dont nous avons vérifié le bien fondé, selon laquelle la phénylalanine est stable en milieu fortement acide, il y avait lieu, *a priori*, de rattacher à une autre cause les écarts constatés par Block et ses collaborateurs et, par là même, de préciser les conditions dans lesquelles le dosage colorimétrique de la phénylalanine dans les protéines peut être correctement effectué.

OBJET DU TRAVAIL.

Le mode opératoire du dosage de la phénylalanine proposé par Block et Bolling [5] a servi de point de départ technique à nos recherches. Ce procédé ne nous a pas donné des résultats satisfaisants, et, par ailleurs, la méthode originale de Kappeler-Adler s'est montrée d'une application souvent incertaine.

Dans celle-ci la colorimétrie directe du chromogène violet obtenu en fin de manipulations oblige à éliminer de l'hydrolysat protéique la tyrosine et l'histidine qui donnent des colorations parasites. L'oxydation de la tyrosine par le permanganate est une opération délicate ; elle ne porte spécifiquement sur cet aminoacide que dans des conditions difficiles à préciser. Par ailleurs, l'élimination de l'histidine par précipitation phosphotungstique peut entraîner des pertes de phénylalanine ; aussi les résultats sont-ils — d'après les résultats de l'auteur — entachés d'une erreur relative de $\pm$ 10 p. 100. Comme il convient d'opérer sur de nombreuses prises d'essai, pour obtenir plusieurs résultats concordants, car l'irrégularité de la nitration peut conduire à des erreurs très importantes dues à la formation de produits colorés en brun, la méthode est par ailleurs laborieuse dans sa mise en œuvre.

L'application de la technique de Block et Bolling ne nous a pas donné davantage de précision dans nos mesures. En outre la décoloration des hydrolysats protéiques par le noir animal préconisée par ces auteurs nous a fourni des résultats défectueux par suite de l'adsorption de cet aminoacide par l'agent de décoloration.

Nous avons tout d'abord repris l'étude systématique des divers temps du dosage de la phénylalanine en so-

lution pure basée sur le principe énoncé par KAPPELER-ADLER [22] et élaboré une technique ne présentant pas les inconvénients des méthodes antérieures. Ces recherches nous ayant permis d'atteindre le but proposé, nous avons par la suite appliqué la méthode mise au point au cours de ce travail, au dosage de la phénylalanine dans diverses protéines pures. Préalablement nous avons confirmé les résultats énoncés par JERVIS, BLOCK, BOLLING et KANZE [20] à savoir que la tyrosine et l'histidine ne gênent pas le dosage à condition que l'on colorimètre la teinte violette obtenue en fin d'opération au moyen d'un filtre coloré à 530 - 560 mμ.

Nous avons étudié par la suite la libération de la phénylalanine des protéines par divers agents d'hydrolyse (SO_4H_2 8 N — HCl 8 N — PO_4H_3 8 N — KOH 8 N). Nous avons trouvé des résultats équivalents en opérant soit sur des hydrolysats sulfuriques décolorés par collage au moyen de baryte saturée à chaud, et non par des agents de décoloration tel que le noir animal ; soit sur des hydrolysats potassiques et même sur les protéines non soumises à un traitement préalable en libérant la phénylalanine.

Ayant ainsi précisé quels agents d'hydrolyse des protéines permettent la mise en liberté de la phénylalanine et défini les conditions du dosage colorimétrique de celle-ci, nous avons appliqué la méthode mise au point au dosage de la phénylalanine dans les protéines.

Plusieurs protéines peuvent être étudiées grâce à celui-ci. Dans un premier travail, nous avons déterminé la teneur en phénylalanine de protéines pures. Nous espérions ainsi, d'une part acquérir des données caractéristiques sur la composition de celles-ci et, d'autre part, mettre en évidence des différences liées à la spécificité de certaines d'entre elles. Cette dernière préoccupation a orienté nos recherches vers les hémoglobines de divers mammifères, les myoglobines et les hémocyanines des invertébrés, pigments respiratoires dont J.

Roche [40] a relié la spécificité à la composition en acides aminés.

Par la suite, nous avons entrepris un ensemble de recherches sur la réactivité de la molécule protéique tant *in vivo*, au cours de remaniements protéiques, qu'*in vitro* au cours de l'hydrolyse pepsique et de réactions d'ioduration conduisant à la formation de thyroxine. Dans le premier ordre d'idées, nous avons recherché si les protéines du muscle et du foie subissent au cours du jeûne et du jeûne azoté des remaniements modifiant leur composition en phénylalanine résultant de leur « dislocation sélective » étudiée par A. Roche [37] et, à propos de cette étude, nous avons déterminé la teneur en phénylalanine du tissu musculaire (muscle perfusé) de divers animaux (vertébrés et invertébrés). Dans le second ordre d'idées nous nous sommes tout d'abord demandé si la phénylalanine était comme la tyrosine et divers acides aminés « en bout de chaîne » susceptible d'être libérée sous l'action de la pepsine et de la papaïne, ce qui permettrait de la considérer comme occupant dans la molécule protéique une position « non nucléaire ». Enfin, l'action directe de l'iode sur les protéines (caséine, sérumalbumine) conduisant à la production de thyroxine (Theorell), nous avons recherché dans quelle mesure la phénylalanine pouvait participer à cette réaction, que l'on admet jusqu'ici porter exclusivement sur la tyrosine.

Tels sont les problèmes auxquels nous avons essayé d'apporter une contribution.

DEUXIEME PARTIE.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Nos recherches comportent trois parties :

1) l'étude du dosage de la phénylalanine basée sur la réaction colorée de KAPPELER-ADLER.

2) l'application du dosage à des protéines pures et à des tissus protéiques prélevés dans diverses conditions expérimentales.

3) l'essai de libération de la phénylalanine par la pepsine et l'étude du comportement de la phénylalanine et de la tyrosine lors des réactions d'ioduration de protéines conduisant à la formation de thyroxine.

CHAPITRE I.

RECHERCHES SUR LE DOSAGE DE LA PHÉNYLALANINE.

Préparation de phénylalanine pure. — Afin d'étudier le dosage de la phénylalanine par la méthode de Block [5] dans les hydrolysats de protéines, nous avons préparé un échantillon de phénylalanine pure, que nous avons utilisé comme produit de référence. Nous avons recristallisé de la *l*-phénylalanine pure (Hofmann-La Roche) de la façon suivante :

5 g. de *l*-phénylalanine sont dissous à chaud dans 50 cm³ d'eau. On filtre à l'ébullition. Le filtrat est reçu dans une capsule ; on le laisse refroidir lentement. Après un séjour d'une nuit à la glacière on filtre sur creuset en verre d'Iéna n° 3. On lave rapidement à l'eau glacée, puis à l'alcool fort ; on sèche à l'éther, puis on place la poudre obtenue dans un dessiccateur à vide contenant de l'anhydride phosphorique. Le produit sec est constitué par des cristaux fins et légers.

Sur cette phénylalanine purifiée nous avons dosé l'azote par micro-Dumas :

Pesée : 3,92 mg. de phénylalanine recristallisée.
Volume d'azote lu : 2,98 cm³ à 761,5 mm. de mercure à 15° C.
Pression corrigée : 760 mm. de mercure.
Température du gaz : 19,5° C.
Coefficient du gaz : 912.
Correction de 2 p. 100 à retrancher du volume par suite de l'adhérence de la potasse au tube de verre : 298 — 6 = 292.

Calcul du pourcentage d'azote : $\frac{292 \times 912 \times 1{,}2508}{392} = 8{,}51$ p. 100 (1,2508 = poids du cm³ d'azote).

Trouvé N = 8,51 p. 100. Valeur théorique = 8,49 p. 100.

I. — Dosage de la phénylalanine en solution pure.

a. Technique de Block et Bolling. — Nous avons employé la phénylalanine recristallisée pour établir une courbe de référence. Pour cela nous avons dissous 100 mg. de ce corps dans 100 cm^3 d'acide sulfurique 2 N et, sur des prises d'essais croissantes, nous avons repéré la division au photomètre de Pulfrich avec un filtre S_{53}, en opérant exactement comme l'indique Block.

Voici les résultats :

Prise d'essai	Lectures (essai I)	Lectures (essai II)
1 cm^3	0,32	0,20
2 cm^3	0,62	0,47
3 cm^3	0,83	0,71
4 cm^3	0,92	1,04

Ces résultats ne sont ni concordants ni comparables.

Il nous a semblé que la cause de ces divergences tenait à la première partie des opérations du dosage, car Kappeler-Adler signale que la nitration de la phénylalanine n'est satisfaisante que si l'on opère en milieu absolument anhydre. Or, il reste toujours des traces d'eau si l'on ne s'entoure pas de toutes les précautions pour chasser l'humidité et, lorsqu'on verse le mélange sulfonitrique à la température ordinaire, ces dernières suffisent à élever la température. Ces surchauffes conduisent alors à la formation de produits polynitrés en positions différentes de sorte qu'on obtient, en fin d'opération, un mélange de composés nitrés donnant, après réduction, des mélanges de diverses colorations.

b. Technique préconisée. — Modifications apportées a la méthode de Kappeler-Adler (*courbe étalon*). — Pour permettre un développement de colorations de teinte constante nous avons apporté diverses modifications à la technique de Block. Nous avons commencé la nitration sur un produit rigoureusement anhydre à 0° C.

avec des réactifs glacés. Quant à la réduction, elle s'est montrée plus avantageuse avec l'acide ascorbique qu'avec l'hydroxylamine, et nous avons adopté l'usage du premier de ces réactifs en l'ajoutant aux produits de la nitration et en alcalinisant ensuite avec de l'ammoniaque. Nous avons contrôlé que l'addition d'acide ascorbique « avant » ou « après » l'alcalinisation était indifférente ; toutefois la coloration se développe plus régulièrement quand on met le réactif « avant » et quand on passe progressivement du milieu très acide au milieu alcalin par adjonction d'ammoniaque par petites fractions.

Avant d'indiquer le mode opératoire auquel nous nous sommes arrêtés nous résumerons les réactifs nécessaires au dosage :

Solution à 20 p. 100 NO_3K dans SO_4H_2 pur ;

Solution préparée extemporanément de 1 p. 100 d'acide ascorbique ;

Ammoniaque concentrée.

Tous les réactifs doivent être portés à 0° au moment de l'usage.

Voici la technique proposée :

Placer dans une capsule de porcelaine 1 à 4 mg. de phénylalanine en solution dans SO_4H_2 2 N. Evaporer au bain-marie avec précautions afin d'éviter toute transformation en matières humiques (brunissement). Lorsque la solution a atteint une consistance sirupeuse, déshydrater en abandonnant quelques heures la capsule dans un exssicateur garni de P_2O_5. Refroidir au bain de glace et verser, goutte à goutte et en agitant vivement à l'aide d'une baguette de verre 2 cm^3 d'une solution de NO_3K à 20 p. 100 glacée. Compléter la nitration en portant 20 minutes au bain-marie bouillant. On obtient une solution à peine jaunâtre. Après refroidissement, transvaser dans un ballon de 25 cm^3 en rinçant trois fois avec 2 cm^3 d'eau glacée. Refroidir au bain de glace.

Ajouter 0,5 cm^3 d'une solution d'acide ascorbique à 1 p. 100 glacée, puis, d'abord goutte à goutte, ensuite par petites portions de l'ammoniaque concentrée refroidie à 0° C. pour compléter le volume à 25 cm^3, le ballon étant placé dans un bain de glace pendant toutes ces opérations. La solution vire au mauve. Après séjour d'une minute à 0° C, le ballon est placé pendant 10 minutes à 37° C. et abandonné pendant 20 minutes à la température du laboratoire. Il se développe alors progressivement une coloration violet pur dont on mesure l'absorption au photomètre de PULFRICH (filtre S_{53} cuve de 10 mm.).

Nous avons adopté le filtre S_{53} parce que la courbe d'absorption du pigment présente un maximum assez large s'étendant de 550 à 530 mμ, ce qui permet d'utiliser indifféremment un filtre sélectif pour l'une ou l'autre de ces longueurs d'onde (S_{55} ou S_{53}). KUHN et DESNUELLE ont employé le filtre S_{53}, BLOCK et ses collaborateurs le filtre S_{55}.

Cette technique permet d'obtenir des résultats très réguliers pour des quantités de phénylalanine comprises entre 1 et 4 mg. Elle doit être suivie rigoureusement pour éviter la formation de produits d'un violet plus ou moins vineux. Nous avons établi des courbes d'étalonnages en nous plaçant dans les conditions que l'on vient de décrire. Voici les résultats :

Prise d'essai	Lectures essai n° 1	Lectures essai n° 2
1	0,29	0,30
1,5	0,42	
2	0,56	0,59
2,5	0,68	
3	0,82	0,82
3,5	0,92	
4	1,04	1,05

L'erreur relative est de ± 2,5 p. 100 au plus ; ces résultats sont satisfaisants et reproductibles aux erreurs

expérimentales près. Nous avons reproduit sur un graphique (figure 1) ci-dessous les résultats de l'essai n° 1. Nous nous sommes reportés à cette courbe d'étalonnage pour une série de dosages. Il y a intérêt cependant à contrôler l'exactitude d'une telle courbe chaque fois que l'on renouvelle un des produits servant à la préparation des réactifs.

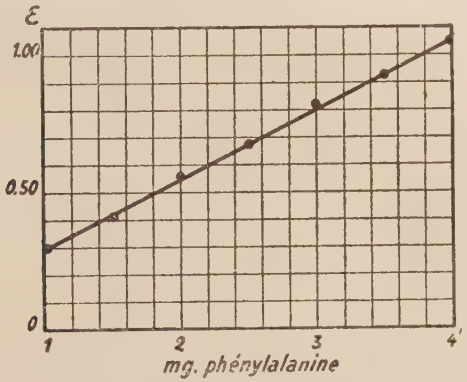


FIGURE 1. — *Courbe d'étalonnage du dosage de la phénylalanine au photomètre de* PULFRICH (filtre S_{53}, cuve de 10 mm. d'épaisseur).

Abscisses : mg. phénylalanine.
Ordonnées : graduations du photomètre ($\varepsilon \times 100$).

II. — Etude du dosage de la phénylalanine dans un mélange d'acides aminés.

Avant d'étudier le dosage de la phénylalanine dans les hydrolysats protéiques nous avons recherché si les différents acides aminés ne produisaient pas de colorations parasites susceptibles de gêner les déterminations. A cet effet, nous avons constitué la solution suivante n° 1 : phénylalanine 100 mg., acide glutamique 600 mg., arginine 100 mg., valine 200 mg., tyrosine 100 mg., histidine 200 mg., cystine 100 mg., lysine 50 mg., méthionine 100 mg. dans 100 cm³ de SO_4H_2 2 N.

Sur ce mélange nous avons effectué le dosage de la phénylalanine en observant les indications données antérieurement.

Prises d'essai du mélange	Lectures au photomètre filtre S_{53} cuve 10 mm.	Correspondance en mg. sur la courbe étalon	Valeur théorique en mg. de phénylalanine
—	—	—	—
2 cm³	0,55	2,05	2,00
2 cm³	0,55	2,05	2,00
3 cm³	0,80	3,00	3,00
3 cm³	0,80	3,00	3,00

Ces données sont comparables, aux erreurs expérimentales près, à celles fournies par la solution pure de phénylalanine. Alors que KAPPELER-ADLER considérait comme indispensable au dosage de la phénylalanine dans les hydrolysats protéiques l'élimination préalable de la tyrosine et de l'histidine, ces résultats confirment les observations de BLOCK et BOLLING à savoir que tel n'est pas le cas lorsque la colorimétrie est opérée en lumière filtrée (S_{53}).

Par ailleurs, BLOCK [5] considère que le dosage de la phénylalanine ajoutée à un hydrolysat protéique conduit à des résultats trop élevés que l'on peut corriger en colorimétrant, en présence d'un témoin contenant du glycocolle en quantité équivalente à celle des acides aminés présents dans le milieu. Avec le mode opératoire que nous avons adopté, le glycocolle (10 mg.) ne donne aucune réaction colorée et l'on a retrouvé quantitativement la phénylalanine dans un mélange contenant p. 100 cm³ 50 mg. de phénylalanine, 75 mg. de glycocolle et 100 mg. d'acide glutamique en se servant d'eau distillée comme témoin.

Dans une deuxième série d'expériences nous avons dissous dans 50 cm³ de SO_4H_2 2 N (solution n° 2) : phénylalanine 49 mg., cystine 50 mg., arginine 100 mg., histidine 50 mg., lysine 50 mg., tyrosine 200 mg., tryptophane 50 mg., méthionine 50 mg.

Sur cette solution n° 2 nous avons effectué le dosage de la phénylalanine.

Prises d'essai du mélange d'aminoacides	Lectures S_{53} cuve 10 mm.	Correspondance de la courbe étalon en mg. de phénylalanine	Valeur théorique en mg de phénylalanine
—	—	—	—
2 cm³	1,02	3,58	1,96
3 cm³	1,08	4,50	2,94

Dans ce cas la coloration traduit une quantité supérieure de phénylalanine à celle qui se trouve effectivement dans le mélange.

Cet excès est dû à une teinte brune qui se superpose à celle, violette, propre à la phénylalanine. Cette réaction parasite ne peut être due qu'au tryptophane puisque c'est le seul acide aminé ne se trouvant pas dans le mélange n° 1. D'ailleurs, pour vérifier cette hypothèse et mettre en évidence le rôle du tryptophane nous avons appliqué le procédé de dosage de la phénylalanine à une solution de tryptophane pure. Pour cela nous avons préparé la solution suivante : 50 mg. de tryptophane dans 50 cm³ de SO_4H_2 2 N. Sur 2 cm³ nous avons effectué le dosage puis nous avons déterminé la coloration obtenue au filtre S_{53} au photomètre de Pulfrich, lecture : 0,46 ; par conséquent le tryptophane gêne le dosage de la phénylalanine. Cependant, l'hydrolyse acide des protéines détruisant le tryptophane, le dosage de la phénylalanine dans de tels hydrolysats est possible.

Par la suite nous avons effectué d'autres essais comparatifs avec la solution de tryptophane et de phénylalanine. Tout d'abord, à une prise d'essai de 2 mg. de phénylalanine nous avons ajouté 2 mg. de tryptophane, puis effectué le dosage comme nous avons indiqué par ailleurs ; nous obtenons une coloration correspondant à 3,62 mg. de phénylalanine en utilisant de l'eau distillée dans la cuve témoin. Par contre si on place comme témoin une solution de tryptophane nitrée puis réduite dans les conditions du dosage, on retrouve 2,02 mg. de

phénylalanine soit sensiblement la quantité à déterminer.

Dans une autre expérience, nous avons ajouté à 2 mg. de phénylalanine 0,5 mg. de tryptophane, puis effectué le dosage ; nous avons obtenu une teinte correspondant à 2,08 mg. de phénylalanine en utilisant de l'eau comme témoin ; dans ce cas le tryptophane ne gêne pas considérablement le dosage.

En résumé, le dosage de la phénylalanine dans un mélange d'acides aminés est directement possible si le mélange est exempt de tryptophane ou bien s'il en contient moins du quart de la quantité de phénylalanine présente ; au contraire un excès de tryptophane gêne le dosage. Cependant, même dans ce cas, si on connaît la quantité de cet amino-acide il développe une coloration propre qui retranchée de la teinte du mélange permet d'obtenir des résultats corrects. Pour cela il suffit d'utiliser comme témoin cette solution de tryptophane nitrée puis réduite. Les colorations dues à la tyrosine et à l'histidine n'entachent d'aucune erreur les dosages de phénylalanine si on opère en lumière filtrée, le filtre S_{53} les éliminant.

III. — Dosage de la phénylalanine dans les hydrolysats de caséine.

Nous avons hydrolysé la caséine dans les conditions identiques à celles décrites par Block [5] et dont nous avons donné la technique précédemment. Nous avons chauffé dans un matras à minéralisation de Kjeldahl surmonté d'un petit réfrigérant d'Hopkins au bain d'huile pendant 20 heures à 130° C, 1500 mg. de caséine pure et dégraissée humide (Hofmann La Roche) avec 15 cm³ SO_4H_2 8 N. Après dilution par 50 cm³ d'eau nous avons ajouté un peu de noir animal pour décolorer, nous avons ensuite filtré, puis lavé le précipité par de

l'eau chaude ; après refroidissement nous avons porté à un volume total de 200 cm³.

D'autre part, nous avons dosé l'azote par micro-kjeldahl de la caséine humide soumise à l'hydrolyse ; nous avons trouvé 12,61 p. 100 d'azote ; or, la caséine pure contient 15,65 p. 100 d'azote, par conséquent les 1500 mg. de caséine hydrolysée correspondent donc à $\frac{1500 \times 12{,}61}{1565} = 1210$ mg. de caséine pure.

Sur l'hydrolysat acide contenant 1210 mg. de caséine pure nous avons effectué le dosage de la phénylalanine en opérant dans les conditions précédemment précisées.

Prises d'essai	Lectures au filtre S_{53}		Correspondance en mg. de phénylalanine
—	—		—
6 cm³	0,33	avec une cuve de 30 mm.	
6 cm³	0,34		1,1 mg.
8 cm³	0,48		
8 cm³	0,44		1,5 mg.

Par cm³ de prise d'essai il y a sensiblement 0,18 mg. de phénylalanine, les mesures étant rapportées à une cuve de 3 cm. L'extinction de la coloration étant sensiblement proportionnelle à l'épaisseur traversée, nous pourrons considérer que par cm³ de solution rapportée à une cuve de 1 cm., il y a sensiblement 0,060 mg. de phénylalanine ; soient 12 mg. pour les 200 cm³ de l'hydrolysat — correspondant à 1210 mg. de caséine pure — donc pour 100 mg. de caséine nous trouvons 0,99 mg. de phénylalanine.

Nous trouvons ainsi dans cet hydrolysat de caséine décoloré au noir animal 0,99 p. 100 de phénylalanine ; dans un autre hydrolysat nous avons trouvé 0,72 p. 100 de phénylalanine, valeurs bien inférieures à celles indiquées par Block (3,8 p. 100) et, plus encore à celles trouvées par Kappeler-Adler (5 p. 100).

Etude de la décoloration au noir animal. — Nous avons déterminé l'azote de la poudre humide par

kjeldahl. Après hydrolyse par SO_4H_2 8 N nous avons retrouvé la quantité d'azote correspondante à la caséine pesée ; mais sur ce même hydrolysat décoloré au charbon nous constatons une perte d'azote importante.

En effet après hydrolyse de 1500 mg. de caséine humide, soit de 1212 mg. de caséine sèche, on en retrouve 1210 mg. Après décoloration au noir animal on en retrouve seulement 975 mg.

Il est donc très probable que le charbon (noir diamant) ait adsorbé une partie des acides aminés. En conséquence il nous a semblé indispensable de contrôler si la phénylalanine ne l'est pas en partie. Pour cela nous avons préparé le mélange suivant : dans 100 cm³ d'eau nous avons dissous 105 mg. de phénylalanine, 100 mg. d'arginine, 600 mg. d'acide glutamique, 200 mg. de valine, 100 mg. de tyrosine. Sur ce mélange nous avons effectué les dosages de phénylalanine avant et après action du noir animal. Voici nos résultats :

1° Avant action du noir.

Prises d'essai	Lectures cuve 1 cm. filtre S_{53}	Correspondance en mg. de phénylalanine	Phénylalanine dans 100 cm³ en moyenne (valeur théorique 105 mg.)
—	—	—	—
2 cm³	0,56	2,08	106 mg.
3 cm³	0,85	3,22	

2° Après action du noir.

Prises d'essai	Lectures	
—	—	
2 cm³	0,06	(non dosable)
3 cm³	0,09	

Il apparaît ainsi que 90 p. 100 de la phénylalanine ont été adsorbés par le noir animal dans ces conditions.

Décoloration au moyen du talc. — Par la suite nous avons recherché si le talc adsorbait la phénylalanine. Dans le mélange précédent nous avons dosé la phénylalanine avant et après action du talc.

Voici les résultats :

1° Avant action du talc.

Prise d'essai	Lecture	Mg. de phénylalanine	Phénylalanine dans 100 cm³
—		—	—
2 cm³	0,56	2,08	104 mg.

2° Après action du talc.

Prise d'essai	Lecture	Mg de phénylalanine	Phénylalanine dans 100 cm³
—	—	—	—
2 cm³	0,27	1,00	50 mg.

Le talc adsorbe ainsi 50 p. 100 environ de la phénylalanine.

En résumé, pour que les valeurs de phénylalanine trouvées dans un hydrolysat soient exactes il faut abandonner l'idée d'obtenir une solution suffisamment décolorée par action du noir animal ou du talc, ces deux corps adsorbant une grande partie de la phénylalanine.

Décoloration des hydrolysats sulfuriques par neutralisation a la baryte. — Pour éclaircir les hydrolysats sulfuriques nous avons essayé la neutralisation à la baryte. Cependant, avant d'employer ce procédé, nous nous sommes assurés que la phénylalanine n'était pas adsorbée par le sulfate de baryum se formant au sein d'un milieu contenant cet acide aminé en solution.

Pour le vérifier nous avons dissous dans 15 cm³ de SO_4H_2 8 N : 100 mg. de phénylalanine, 100 mg. de tyrosine, 100 mg. d'arginine, 75 mg. d'histidine. A ce mélange nous avons ajouté 18 cm³ de solution de baryte saturée à l'ébullition. Après agitation, nous avons centrifugé pendant 5 minutes à 3000 tours, nous avons ensuite décanté le liquide dans un ballon jaugé à 200 cm³. Le culot est lavé à l'eau bouillante, puis la suspension est à nouveau centrifugée. Les eaux de lavage sont transvasées dans le ballon jaugé. Nous avons répété trois fois cette opération. Nous avons complété ensuite à 200 cm³ par de l'eau distillée.

Sur cette solution neutre et incolore nous avons dosé la phénylalanine.

Prise d'essai	Lectures cuve 1 cm.	Correspondance en mg. de phénylalanine	Phénylalanine dans les 200 cm³ (valeur théorique 100 mg.)
—	—	—	—
3 cm³	0,39	1,45	97 mg.
5 cm³	0,65	2,46	

Comme théoriquement dans les 200 cm³ du mélange il y a 100 mg. de phénylalanine on peut conclure que le sulfate de baryum n'adsorbe pas la phénylalanine.

D'autre part, afin de nous assurer si le chauffage en milieu sulfurique ne détruit pas une partie de la phénylalanine, nous avons laissé au bain d'huile pendant 24 heures à 130° C. dans un matras à minéralisation de kjeldahl surmonté d'un petit réfrigérant, le mélange suivant : 100 mg. de phénylalanine, 100 mg. de tyrosine, 100 mg. d'arginine, 45 mg. de tryptophane, 75 mg. d'histidine, dans 15 cm³ de SO_4H_2 8 N.

Le chauffage terminé, nous avons transvasé quantitativement le contenu du matras dans un tube à centrifuger et ajouté la quantité de baryte saturée à l'ébullition nécessaire pour obtenir la neutralisation. Nous avons opéré ensuite comme nous venons de le signaler, puis porté à 200 cm³.

Voici les résultats du dosage de la phénylalanine :

Prises d'essai	Lectures	Correspondance en mg. de phénylalanine	Phénylalanine dans les 200 cm³ (valeur théorique 100 mg.)
—	—	—	—
4 cm³	0,54	2,00	102 mg.
7 cm³	0,96	3,62	

Nous pouvons déduire de ces dosages que la phénylalanine résiste aux conditions de chauffage fixées précédemment. En outre, ces résultats confirment encore que le sulfate de baryum n'adsorbe pas cet acide aminé.

Hydrolysat sulfurique de caséine. — Ces contrôles étant effectués, nous avons repris nos essais sur les hydrolysats de caséine.

Après chauffage de 1500 mg. environ de caséine humide à 130° C. avec 15 cm³ d'acide sulfurique 8 N pendant 20 heures, nous avons transvasé quantitativement l'hydrolysat dans un tube à centrifuger puis ajouté la quantité de solution de baryte saturée à l'ébullition nécessaire pour obtenir la neutralisation (22 cm³). Après centrifugation, le liquide surnageant est versé dans un ballon jaugé à 200 cm³. Le culot est ensuite remis en suspension dans de l'eau bouillante, puis après centrifugation le liquide de lavage est réuni au produit de la neutralisation. Nous avons répété ainsi 4 fois cette opération. Nous avons complété à 200 cm³ avec de l'eau distillée.

L'hydrolysat limpide est à peine coloré en jaune paille. Sur cette solution nous avons dosé l'azote par kjeldahl. Dans les 200 cm³ de l'hydrolysat nous en avons trouvé 183,3 mg. ; il faut encore ajouter 5 p. 100 provenant de l'azote humique séparé par collage par le sulfate de baryum, il y a donc 192,8 mg. d'azote. La caséine pure contient 15,65 p. 100 d'azote ; par conséquent nous avons hydrolysé 1233 mg. de caséine pure.

Sur cet hydrolysat nous avons effectué le dosage de la phénylalanine :

Prises d'essai en cm³	Lectures cuve 1 cm. filtre S_{53}	Correspondance en mg.	Phénylalanine dans les 200 cm³ d'hydrolysat provenant de 1233 mg. de caséine pure	Pourcentage de phénylalanine
—	—	—	—	—
3	0,30	1,10	74 mg.	6,01
5	0,50	1,86		

Nous avons répété les dosages de phénylalanine sur d'autres hydrolysats d'une même préparation de caséine, les hydrolyses ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles que nous venons de décrire. Voici nos

résultats : 6,08 — 6,11 — 5,81 — 6,27 — 6,27 p. 100 de phénylalanine (moyenne 6,02 p. 100).

Les valeurs déterminées par Block et ses collaborateurs sont de 3,9 p. 100 sur les hydrolysats sulfuriques décolorés au charbon et de 5,8 p. 100 sur ceux résultant de l'action de la soude. Dès lors, il est probable que l'adsorption de la phénylalanine au charbon est responsable des erreurs que les auteurs américains attribuent à l'emploi de l'acide sulfurique et au manque de fidélité de la technique initiale de Block et Bolling.

Ce fait acquis, nous avons comparé la valeur trouvée par action de bases ou d'acides pouvant être mis en œuvre comme agents d'hydrolyse.

Etude de l'hydrolyse alcaline de la caséine. — Nous avons utilisé comme agent de l'hydrolyse de la potasse 8 N. En effet, la neutralisation de l'hydrolysat par l'acide sulfurique donne un sel cristallisant anhydre alors que, si on utilise la soude, il se forme un sel hydraté. Comme il est très difficile de chasser l'eau de cristallisation du sulfate de soude, nous aurions été amenés à effectuer les opérations de nitration dans des conditions non satisfaisantes. D'autre part, la réaction colorée donnée par le tryptophane est peu intense et elle n'entache les résultats d'une erreur appréciable que si la prise d'essai renferme plus de 0,5 mg. de tryptophane. La mise en œuvre des hydrolysats alcalins de caséine a permis d'obtenir des résultats satisfaisants, étant donné que cette protéine est beaucoup plus riche en phénylalanine qu'en tryptophane.

Préalablement à l'étude de l'hydrolyse par KOH 8 N nous avons vérifié que la phénylalanine résistait à l'action de cet alcali dans les conditions de chauffage des hydrolysats. Pour cela, nous avons chauffé pendant 3 heures à 130° C., au bain d'huile, dans un matras à minéralisation de Kjeldahl surmonté d'un condensateur à reflux, 105 mg. de phénylalanine avec 5 cm^3 de KOH 8 N. Après ce temps de chauffage, nous avons transvasé

quantitativement le contenu du matras dans un ballon jaugé à 100 cm³ ; après acidification par SO_4H_2 8 N jusqu'à pH = 4,0 environ, nous avons ajusté à 100 cm³ avec de l'eau distillée. Nous avons prélevé 2 et 3 cm³ de cette solution et dosé la phénylalanine.

Prises d'essai	Lectures	Correspondance en mg.	Valeurs théoriques
—	—	—	—
2 cm³	0,55	2,08	2,10
3 cm³	0,81	3,04	3,15

La phénylalanine n'est donc pas détruite par chauffage dans KOH 8 N.

Dans une première série d'hydrolyses alcalines de la caséine nous avons utilisé 1500 mg. exactement de caséine humide soit 1210 mg. de caséine pure que nous avons placés au bain d'huile à 130° C. pendant 2 heures avec 15 cm³ de KOH 8 N. On acidifie avec SO_4H_2 8 N. Lorsqu'on est en milieu acide un louche se produit. On revient alors en milieu légèrement alcalin avec KOH 8 N juste pour permettre la dissolution du précipité. On complète alors à 200 cm³ avec de l'eau distillée. On dose la phénylalanine sur 5 et 7 cm³.

Prises d'essai en cm³	Lectures cuve 1 cm. filtre S_{53}	Correspondance en mg.	Phénylalanine dans les 200 cm³ d'hydrolysat provenant de 1210 mg. de caséine pure	Pourcentage de phénylalanine
—	—	—	—	—
5 cm³ + 1,5 cm³ SO_4H_2 2 N.	0,49	1,82		
7 cm³ + 2,1 cm³ SO_4H_2 2 N.	0,70	2,60	73,6 mg.	6,10

Nous avons recommencé les dosages de phénylalanine sur d'autres hydrolysats par KOH 8 N d'une même préparation de caséine. Voici les résultats que nous avons trouvé : 6,05 — 6,21 — 5,99 — 5,67 ; moyenne 6,00 p. 100.

Hydrolyse chlorhydrique de la caséine. — Nous avons hydrolysé 1500 mg. exactement de caséine humide — soit 1210 mg. de caséine sèche — dans un ma-

tras à minéralisation kjeldahl, surmonté d'un condensateur à reflux, avec 15 cm³ de HCl 8 N pendant 22 heures au bain d'huile à 130° C. La solution étant peu colorée le HCl est chassé par évaporation au bain-marie car son élimination à l'état de sel d'argent entraîne des pertes importantes de phénylalanine. L'hydrolysat est porté à un volume de 200 cm³ sur lequel nous avons dosé cet aminoacide.

Prises d'essai en cm³	Lectures (S_{53})	Correspondance en mg.	Quantité de phénylalanine dans les 200 cm³	P. 100 de phénylalanine
—	—	—	—	—
3 cm³	0,32	1,00		
5 cm³	0,48	1,62	65,4 mg.	5,4

Le dosage de la phénylalanine dans l'hydrolysat de caséine par HCl 8 N indique une teneur de 5,4 p. 100 en phénylalanine.

Hydrolyse phosphorique de la caséine. — Comme dans l'expérience précédente nous avons hydrolysé 1500 mg. environ de caséine humide pendant 22 heures à 130° C. par 15 cm³ de PO_4H_3 8 N.

Après hydrolyse nous avons éliminé l'acide phosphorique à l'état de phosphate de baryum en milieu légèrement alcalin, à l'aide d'un procédé analogue à celui décrit à propos de l'élimination de SO_4H_2. L'excès de baryte a été précipité à l'état de sulfate de baryum.

Ces opérations terminées nous avons porté à un volume total de 200 cm³. Sur cette solution filtrée nous avons effectué le dosage de la phénylalanine.

Prises d'essai en cm³	Lectures cuve 1 cm.	Correspondance en mg. de phénylalanine	Quantité de phénylalanine dans les 200 cm³ d'hydrolysat de 1283 mg. de caséine sèche	P. 100 de phénylalanine
—	—	—	—	—
3	0,32	1,00		
5	0,52	1,78	68,2 mg.	5,31
8	0,76	2,70		

L'hydrolysat de la caséine par PO_4H_3 8 N sur lequel nous avons dosé la phénylalanine a donné un taux de 5,31 p. 100 en cet aminoacide.

IV. — Dosage de la phénylalanine dans la caséine avant hydrolyse.

Nous avons effectué la nitration après avoir placé 30 et 40 mg. de caséine humide à l'étuve à 100° C. pendant 12 heures pour la dessécher, par le réactif sulfo-nitrique glacé en homogéinisant bien. Nous avons opéré ensuite comme à l'ordinaire.

Pesées en mg. de caséine humide	Lectures cuve 1 cm. filtre S_{53}	Correspondance en mg. de phénylalanine	P. 100 de phénylalanine
—	—	—	—
30 mg.	0,45	1,50	5,91
40 mg.	0,54	1,88	5,52

Nous avons trouvé sur d'autres essais : 5,91 — 5,54 p. 100. La teneur moyenne est de 5,72 p. 100.

Nous résumons dans le tableau ci-après les divers résultats trouvés :

TABLEAU I. — *Valeur comparée de divers agents d'hydrolyse pour le dosage de la phénylalanine dans la caséine*

Agent d'hydrolyse	Teneur en phénylalanine p. 100	Erreur relative (*)
SO_4H_2 8N	6,08	— 1,0 p. 100
	6,01	— 0,2
	6,11	+ 1,5
	5,81	— 3,5
	6,27	+ 4,1
	6,27	+ 4,1
	Moyenne : **6,02**	
HI 8N	5,40	—
PO_4H_3 8N	5,31	—
KOH 8N	6,10	+ 1,7 p 100
	6,05	+ 0,8
	6,21	— 3,5
	5,99	— 0,2
	5,67	— 5,5
	Moyenne : **6,00**	
Sans hydrolyse	5,91	+ 3,3
	5,91	+ 3,3
	5,54	— 3,2
	5,52	— 3,5
	Moyenne : **5,72**	

(*) Par rapport aux valeurs moyennes de chaque type d'hydrolyse.

L'étude des données rassemblées dans ce tableau montre que, contrairement aux conclusions de Block et de ses collaborateurs, les hydrolyses sulfurique et potassique sont équivalentes et, par ailleurs, leurs résultats ne sont supérieurs que de 5 p. 100 environ à ceux obtenus sur les protéines non soumises à un traitement préalable en libérant la phénylalanine. Ces modes d'hy-

drolyse doivent être préférés à l'emploi des acides phosphorique et chlorhydrique, lequel entraîne de petites pertes, probablement au cours de l'élimination de PO_4H_3 par la baryte dans le premier cas et en raison de la persistance de HCl (chlorhydrates des acides aminés) gênant la régularité de la nitration dans le second.

En pratique, il ne convient pas de retenir le dosage direct sur la protéine, car celle-ci se rassemble souvent en flocons très difficiles à nitrer correctement et l'hydrolyse est une opération préalable au dosage qu'il vaut mieux réaliser. Toutefois, les résultats trouvés par dosage direct montrent que la nature du radical (reste d'alanine ou chaîne polypeptidique plus ou moins longue) lié au cycle du dérivé dinitrobenzénique formé au cours du dosage n'exerce qu'une influence minime sur l'intensité de la réaction colorée, comme le pensent Block et Bolling.

Ainsi donc, chacun des deux réactifs donnant les résultats les plus élevés, à savoir SO_4H_2 et KOH, peuvent être indifféremment employés, le choix de l'un d'eux étant dicté par le but du travail que l'on se propose d'atteindre et sa mise en œuvre réglée dans les conditions où nous nous sommes placés.

L'hydrolyse sulfurique ne doit en aucun cas être suivie d'une décoloration des solutions qu'elle permet d'obtenir par un produit adsorbant la phénylalanine (charbon, talc), l'élimination des matières humiques devant être assurée en même temps que celle de SO_4H_2 par la formation de SO_4Ba selon le mode opératoire précédemment indiqué. Elle présente l'inconvénient d'être longue et de comporter des opérations multiples en vue de la préparation des prises d'essai, mais elle a l'avantage de fournir un hydrolysat auquel le dosage des divers acides aminés (à l'exception du tryptophane) peut être appliqué. Elle doit donc être mise en œuvre lorsqu'on se propose de faire une analyse étendue de la composition en acides aminés d'une protéine.

L'hydrolyse alcaline, rapide et ne conduisant pas en général à la formation de matières humiques en quantité susceptible de gêner le dosage de la phénylalanine est, en revanche, le procédé de choix lorsqu'on se propose de déterminer la teneur en phénylalanine, en tryptophane et en tyrosine d'une protéine, ces acides aminés n'étant alors pas altérés tandis que d'autres (cystéine, arginine, etc.) le sont alors. Il convient seulement de ne la mettre en œuvre que sur des prises d'essai renfermant au plus 0,5 mg. de tryptophane.

Ces deux procédés donnent, dans les conditions où nous sommes placés, des résultats identiques. Par ailleurs, la phénylalanine ajoutée aux protéines, avant hydrolyse sulfurique ou potassique étant retrouvée quantitativement après celles-ci, il y a lieu de penser que le dosage de cet acide aminé dans les protéines, tel qu'il est décrit dans ce travail, permet de déterminer leur teneur réelle en ce corps. Sa précision, légèrement inférieure à celle du dosage en solution pure, est de $\pm$ 5 p. 100 comme en rend compte l'examen du tableau précédent, et l'obtention de résultats satisfaisants exige l'exécution de deux hydrolyses et celle de deux dosages sur chaque hydrolysat (50 à 400 mg. de protéine selon la teneur en phénylalanine de la protéine).

CHAPITRE II.

APPLICATION DU DOSAGE A DES PROTÉINES PURES ET A DES TISSUS.

A. — Teneur en phénylalanine des protéines.

En dehors des valeurs déterminées par KAPFELER-ADLER, BLOCK et ses collaborateurs, les résultats des dosages obtenus par les anciennes méthodes (FISCHER, KOLLMANN) ne méritent pas d'être retenus. Aussi, nous a-t-il paru utile, étant donné l'intérêt biochimique et physiologique de la phénylalanine, de doser cet acide aminé dans diverses protéines pures. Les produits analysés ont été préparés ou purifiés au laboratoire au moyen des techniques classiques, à l'exception d'une protéine de BENCE-JONES que nous remercions M. le Professeur CRISTOL de nous avoir adressée et d'une élastine provenant des collections du laboratoire. Leur pureté a été contrôlée par le dosage de la teneur en azote et en cendres.

Nous avons effectué les dosages de phénylalanine dans des hydrolysats sulfuriques de diverses protéines en suivant le mode opératoire adopté pour déterminer la teneur en cet acide aminé dans les hydrolysats de caséine. Les valeurs moyennes des résultats obtenus ont été rassemblées dans le tableau II.

TABLEAU II. — *Teneur en phénylalanine de diverses protéines.*

Protéine		Phénylalanine p. 100
A. Euprotéines		
Albumines	Lactalbumine	4,99
	Ovalbumine	6,38
	Pr. d. Bence Jones	2,38
	Sérumalbumine (Hom.)	6,12
Globulines	Edestine	6,14
	Thyroglobuline	6,68
Histone	Thymohistone	2,61
Protamines	Gliadine	6,80
	Zéine	7,44
Scléroprotéines	Elastine	trace indos
	Fibroïne	2,34
	Kératine (Cheveux)	1,65
	Kératine (Laine)	3,66
	Osséine	1,88
B. Phosphoprotéine		
	Caséine (Vache)	6,01

Protéine		Phénylalanine p. 100
C. Pigments respiratoires		
Hémoglobines (Sang)	Bœuf	7,50
	Cheval	7,36
	Cheval	8,01
	Cheval	7,85
	Chien	8,46
	Homme	8,61
	Homme	8,22
	Homme	8,41
	Lapin	9,49
	Mouton	8,78
	Porc	8,46
	Porc	8,30
Myoglobine (Muscle)	Chien	6,44
Hémocyanines	Crabe	10,70
	Escargot	9,12
	Limule	6,84
	Poulpe	9,00
	Seiche	9,16
	Seiche	8,88

Ces données sont très voisines de celles déterminées par Block et ses collaborateurs (après hydrolyse alcaline) sur la caséine (5,8 p. 100), la lactalbumine (4,8 p. 100), et l'ovalbumine (6,8 p. 100) ; après hydrolyse acide (caséine : 3,38 p. 100). Elles sont, par contre, notablement supérieures à celles obtenues par Kappeler-Adler : caséine (5,0 p. 100), édestine (3,92 p. 100), hémoglobine (5,34 p. 100), zéine (5,03 p. 100), sauf en ce qui concerne l'élastine (3,34 p. 100) ; mais il est possible que les produits étudiés sous ce nom aient été constitués par des mélanges mal définis.

Divers faits ressortent de l'examen de ce tableau. D'une part, la phénylalanine est très répandue dans les protéines, comme l'avaient déjà montré les observations d'Abderhalden, Osborne et de leurs collaborateurs ;

les scléroprotéines seules en sont uniformément pauvres, les teneurs en cet acide aminé des corps d'autres groupes n'étant pas homogènes et ne pouvant constituer un élément de classification des protéines. D'autre part, la diversité du taux des pigments respiratoires en phénylalanine traduit leur spécificité, à l'étude de laquelle J. Roche a consacré un ensemble de recherches.

Dans le cadre des pigments hémoglobiniques on remarque que les hémoglobines (pigments sanguins) et la myoglobine étudiée (pigment musculaire) ont une teneur en phénylalanine d'un ordre de grandeur différent, celle de la dernière (préparée à partir des muscles d'environ 20 animaux) étant beaucoup plus faible ; c'est là une manifestation de la diversité de composition en acides aminés de ces deux chromoprotéides hématiniques, dont J. Roche, Derrien et Vieil [41] ont poursuivi l'étude systématique. De plus, si les écarts observés entre la teneur en phénylalanine des hémoglobines des diverses espèces (Bœuf, *Bos taurus* : 7,50 p. 100 ; Cheval, *Equus caballus* : 7,74 p. 100 ; Chien *Canis lupus* : 8,46 ; Homme, *Homo sapiens* : 8,44 ; Lapin, *Lepus cuniculus* : 9,49 ; Mouton, *Ovis aries* : 8,78 ; Porc, *Suus domesticus* : 8,44 p. 100) sont peu élevés, certains d'entre eux dépassent la marge d'erreurs de la méthode ; ils traduisent donc la spécificité de ces pigments.

Les différences entre les hémocyanines sont plus marquées et plus suggestives. En effet, le pigment respiratoire du crustacé étudié, le Crabe (*Carcinus moenas*) est, sans conteste, plus riche en phénylalanine que celui des mollusques (Escargot, *Helix pomatia* ; Poulpe, *Octopus vulgaris* ; Seiche, *Sepia officinalis*). Or, d'autres éléments de la composition des hémocyanines, en particulier la diversité de leur teneur en cuivre (0,17 p. 100 chez les Crustacés et 0,25 p. 100 chez les Mollusques) et en certains acides aminés ont déjà permis à Hernler et Philippi, à Roche, Dubouloz et Jean, de séparer en deux groupes chimiques distincts les hémocyanines de

ces deux classes d'animaux. Quant à l'hémocyanine de la Limule (*Limulus polyphemus*), elle est beaucoup plus pauvre en phénylalanine que celle des Crustacés, ce qui contrôle à nouveau par voie biochimique la différenciation de cette espèce pendant longtemps rangée parmi les crustacés, en raison de ses caractères morphologiques et que les zoologistes considèrent aujourd'hui comme un Arachnide de type archaïque (Xiphosure).

Ainsi l'étude de la teneur en phénylalanine des protéines apporte, en dehors de l'établissement de données analytiques sur la composition de ces corps, une contribution à la biochimie comparée des pigments respiratoires.

B. — Teneur en phénylalanine des tissus protéiques.

Nous avons d'abord effectué les dosages de la phénylalanine dans des hydrolysats sulfuriques de muscles d'animaux normaux perfusés au liquide de Ringer jusqu'à élimination totale du sang (*).

Sitôt après avoir sacrifié l'animal les muscles sont immédiatement séchés à l'étuve à 105° C. et pulvérisés. Voici dans le tableau III les résultats de nos dosages.

TABLEAU III. — *Teneur en phénylalanine de tissus protéiques.*

Muscles de	Phénylalanine p. 100
Anguille	3,91
Chat	4,06
Chien	3,42
Homard	4,60
Lapin	4,07
Morue	3,74
Rat	4,34

(*) Ces produits, provenant des collections du laboratoire, ont été préparés par V. Henriquès et A. Roche en vue du dosage du fer tissulaire, grâce à une technique de perfusion mécanique ayant permis l'élimination complète du sang (vertébrés) ou de l'hémolymphe (Homard).

La teneur en phénylalanine des muscles de divers animaux est donc très voisine de 4 p. 100 et l'on ne saurait considérer les faibles écarts observés comme traduisant une spécificité de composition. Tout au plus peut-on noter que le muscle de Homard est plus riche en cet acide aminé que celui des vertébrés marins étudiés.

C. — Teneur en phénylalanine des protéines hépatiques de rats normaux et en inanition totale ou protéique.

Nous avons ensuite étudié la teneur en phénylalanine des protéines hépatiques (tissu hépatique débarrassé de la capsule fibreuse du foie) dont l'intérêt physiologique particulier tient au fait qu'une partie d'entre elle constitue une réserve protéique très facilement mobilisable. On sait en effet (Addis Poo et Lew [3] ; A. et J. Roche, Passelaigue, Fouquet, Drouineau [39]) que, dans le rat, 50 p. 100 environ de protéines hépatiques disparaissent au cours du jeûne total ou du jeûne azoté, un jeûne de vingt-quatre heures provoquant déjà une mobilisation presque totale de ces réserves hépatiques. On peut penser que la composition de celles-ci diffère de celle du protoplasme « actif » des cellules hépatiques, mais Luck [26] n'a pas réussi à fractionner les constituants protéiques de cet organe. Par ailleurs, la « dislocation sélective des protéines » (A. Roche [37, 38]), lors de protéolyse endocellulaire paraissant libérer préférentiellement certains acides aminés, il convenait de se demander si la phénylalanine n'est pas l'un de ceux-ci. Nous avons pensé apporter une contribution utile à l'étude des protéines du foie en dosant la phénylalanine des protéines totales des cellules hépatiques ou d'animaux normaux, ou chez les sujets en période de jeûne total ou protéique assez longue pour que l'épuisement des réserves azotées du foie soit atteint.

Les rats normaux pesaient de 117 à 135 g. ; ceux sou-

mis à la diète hydrique pendant trois jours et provenant du même élevage, ont perdu de 15 à 30 p. 100 de leur poids. Les rats mis à l'inanition azotée pendant 16 jours ont reçu un régime composé ainsi : amidon 70, graisse lavée 30, mélange salin d'Osborne 5, sciure lavée 5, vitamines. Après une diète hydrique de deux jours destinée à débarrasser complètement le tube digestif de l'azote exogène, les animaux sont soumis au régime ternaire précédent. Les animaux conservent une vitalité et une digestion normales. Après 16 jours de ce régime ils ont perdu 25 à 40 p. 100 de leur poids.

Les protéines hépatiques ont été préparées de la façon suivante (Y. Emond [12]) : Sitôt après avoir sacrifié l'animal le foie est broyé au mortier avec du chlorure de sodium cristallisé ajouté en excès, de manière à agir à la fois mécaniquement et comme agent de plasmolyse. Quand la masse a pris une teinte rose uniforme, elle est reprise par une solution tampon acéto-acétique M/5 (1 à 2 cm^3 par g. de tissu) ; une partie se dissout alors. On répète cette opération autant de fois qu'il est nécessaire pour que la totalité des protéines solubles soit extraite. Le résidu insoluble ne constituant qu'une très faible partie des purées de foie mises en expérience nous n'avons étudié seulement que les protéines solubles dans le tampon acéto-acétique. Les fractions solubles ainsi séparées sont coagulées par séjour d'une demi-heure au bain-marie bouillant. Après refroidissement, les protéines coagulées sont séparées par centrifugation. Elles sont lavées plusieurs fois à l'eau chaude pour enlever le chlorure de sodium, puis lavées à l'alcool et séchées à l'étuve à 100° et broyées au mortier.

Les protéines hépatiques ainsi préparées sont hydrolysées par SO_4H_2 8 N au bain d'huile à 130° C. pendant 20 heures ; et nous avons dosé la phénylalanine sur l'hydrolysat.

Les résultats obtenus sont les suivants :

TABLEAU IV. — *Teneur en phénylalanine des protéines hépatiques de rats.*

Conditions des animaux	Teneur en phénylalanine p. 100 des protéines hépatiques
Normaux (valeurs individuelles)	6,03 — 6,37 — 5,75
Normaux (échantillon moyen de 6 animaux)	6,08
Inanitiés (valeurs individuelles).	5,43 — 5,67 — 6,20
Inanities protéiques (valeurs individuelles)	5,47 — 6,05 — 5,90
Inanitiés protéiques (valeurs moyennes de 6 animaux)	6,03 — 6,35 — 6,13

Il est donc certain que les protéines de réserve du foie ne sauraient être différenciées de celles constituant le protoplasma actif de cet organe par leur teneur en phénylalanine et que, par ailleurs, cet acide aminé n'est pas détaché sélectivement, en abondance tout au moins, au cours de la dislocation sélective des protéines d'organe ayant lieu lors de la protéolyse cellulaire. A cet égard nos résultats méritent d'être rapprochés de ceux de Block, Jervis, Bolling et Webb [8] montrant que les protéines de tissus de sujets normaux et de sujets oligophréniques présentant une excrétion notable d'acide phénylpyruvique, produit de désamination de la phénylalanine, renferment cet acide aminé au même taux, bien que le métabolisme comporte chez les seconds une véritable « fuite ». Pour autant qu'une recherche de ce type puisse permettre des déductions sur la position d'un acide aminé dans la molécule protéique, la phénylalanine ne semble donc ni douée d'une labilité exceptionnelle correspondant à une position en « bout de chaîne », ni comprise dans une partie nucléaire (Kossel, Siegfried) difficilement mobilisable.

CHAPITRE III.

POSITION ET RÉACTIVITÉ DE LA PHÉNYLALANINE DANS LES MOLÉCULES PROTÉIQUES.

Chacun des acides aminés occupe dans les molécules protéiques une place particulière, qu'il est la plupart du temps très difficile de préciser. On peut se demander, par exemple, si certains d'entre eux existent à l'extrémité des chaînes polypeptidiques fondamentales et par ailleurs leur réactivité permet, dans certains cas, de préciser si certains de leurs groupements fonctionnels sont libres ou engagés dans des combinaisons.

Un ensemble de recherches classiques dûes en particulier à STRAUP, à FELIX, à EDEBACHER, à GOLDSCHMIDT et à STEGERWALD (*) a montré que la plupart des groupements aminés primaires des molécules protéiques sont des groupes ε-aminé de la lysine. Toutefois, dans le cas particulier de l'insuline tout au moins, une partie de ces groupements appartient à la phénylalanine. En effet, JENSEN et EVANS [19] ont isolé la phénylhydantoïne de la phénylalanine après hydrolyse acide du phénylisocyanate d'insuline, composé dans lequel l'azote aminé — dosé par la méthode de VAN SLYKE — a presque complètement disparu. Ce résultat indique que l'insuline possède des groupements aminés libres constitués par de la phénylalanine, ce qui confère à cet amino-

(*) On trouvera un résumé de la question sur l'ouvrage suivant : Die Strukturchemie der Aminosäuren und Eiweisskörper von Prof. Dr. S. EDLBACHER, 1 vol., 188 p., F. Deuticke édi., Leipzig und Wien 1927.

acide une position privilégiée dans la molécule le rendant plus apte à réagir.

Nous nous sommes proposés de rechercher d'une part si la pepsine et la papaïne [14, 42] libèrent de la phénylalanine dans leur action sur la caséine et d'autre part si le cycle benzénique de l'acide aminé est susceptible de fixer l'iode lorsque celui-ci est mis en présence d'une protéine. Theorell et divers auteurs ont établi que dans ces conditions de la thyroxine prend naissance et l'on peut se demander si cette hormone se forme exclusivement à partir de la tyrosine préexistente ou si la phénylalanine ne participe pas à sa genèse.

I. — Essai de libération de la phénylalanine par les ferments protéolytiques.

Selon la conception classique les protéinases dédoublent les protéines en polypeptides de poids moléculaire élevé (peptones, albumoses) lesquels sont hydrolysés en acides aminés par les peptidases (amino- et carboxypeptidases, dipeptidases, prolinases, protidases). En réalité, un ensemble de travaux, dont les principaux sont dûs à Bergmann et à ses élèves, a montré que les protéinases du type pepsique ou papaïne sont aptes à libérer certains acides aminés « en bout de chaîne » et tout l'ammoniaque compris dans les groupements amidés.

Contrairement aux anciennes recherches d'Abderhalden [2], selon lequel la protéolyse pepsique de la caséine ne libère, comme produit de poids moléculaire peu élevé, que des polypeptides riches en phénylalanine et en proline, il est certain que des acides aminés se forment au cours de ce processus, probablement aux dépens de peptones primitivement libérées. Calvery et Schock [9] ont constaté que de la tyrosine apparaît lors de l'action de la pepsine sur la caséine et Northrop [35] a fait la même observation au cours de l'autodigestion de la pepsine. De même, la pepsine dédouble des amides

en donnant naissance à de l'ammoniac [44]. Si la phénylalanine n'a pas été signalée parmi les produits de la protéolyse pepsique, elle est par contre au nombre des acides aminés libérés par la papaïne à partir de la fibrine. Bergmann et Niemann [4] en ont en effet isolé 3,3 g. à partir de produits de la digestion de 1172 g. de fibrine en même temps que de la leucine, de l'isoleucine, de la tyrosine et de l'arginine.

a. Essai de libération par la pepsine chlorhydrique. — Nous avons appliqué notre technique de dosage à l'étude de la libération de la phénylalanine de l'édestine par la pepsine chlorhydrique.

Voici le mode opératoire employé :

Nous avons dissous 2 g. d'édestine dans 250 cm³ HCl N/300 au bain-marie. Nous avons ajusté le pH à 1,8 en ajoutant d'abord 6,5 cm³ HCl N et ensuite 1 cm³ HCl 10 N. Nous avons versé ensuite 25 cm³ d'une solution HCl N/100 contenant 200 mg. de pepsine. Nous avons placé cette solution sous toluène à l'étuve à 37° C. pendant 432 heures.

Après cette période de réaction nous avons neutralisé par de la KOH 2 N, puis nous avons porté au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. Nous avons ensuite filtré, lavé le précipité restant sur le filtre avec un peu d'eau chaude puis ajouté au filtrat goutte à goutte du réactif phosphotungstique à 10 p. 100 jusqu'à apparition de louche léger. Nous avons chauffé avec précaution pour redissoudre le précipité, puis laissé une nuit à la glacière. Le lendemain nous avons filtré, lavé le précipité avec trois fois 10 cm³ d'eau. Le filtrat neutralisé à la KOH 8 N est porté à un volume total de 400 cm³. Sur une prise d'essai de 20 cm³ correspondant à 100 mg. d'édestine nous avons déterminé la phénylalanine comme nous avons indiqué tout au cours de ce travail ; le résultat a été négatif. Nous avons recommencé sur 80 cm³ de filtrat, toujours aucune coloration après nitration puis réduction ; sur 200 cm³ de filtrat,

correspondant à 1 g. d'édestine soit 61,4 mg. de phénylalanine, le dosage s'est également avéré impossible.

En conséquence, nous pouvons conclure que dans les conditions où nous nous sommes placés la phénylalanine n'a pas été libérée de l'édestine par la pepsine chlorhydrique, la technique employée permettant de mettre en évidence 1 p. 100 de l'acide aminé présent dans la protéine, à l'état libre. Toutefois il y aurait intérêt, pour formuler une conclusion définitive, à reprendre cette expérience en la poursuivant plus longtemps et en renouvelant les quantités d'enzyme à intervalle régulier.

b. Essai de libération par la papaïne. — Par ailleurs, nous avons recherché si la phénylalanine était libérée de la caséine après action prolongée de la papaïne. Pour cela nous avons dissous 375 mg. de caséine pure dans 100 cm³ d'une solution contenant 37,5 mg. de papaïne et 5 cm³ d'une solution de cyanure de potassium à 10 p. 100 neutralisée à pH = 5,5 environ au moyen de rouge de méthyle. Cette digestion de pH = 7,6, placée à l'étuve à 40° C. sous toluène pendant 15 jours, est abandonnée ensuite pendant 5 mois à la température du laboratoire. Après ce temps de réaction nous avons soigneusement décanté le toluène et traité 100 cm³ de solution de la façon suivante : nous avons ajouté la quantité d'acide phosphotungstique à 10 p. 100 nécessaire pour obtenir l'apparition d'un léger louche. Après avoir abandonné quelques heures à la glacière nous avons centrifugé et lavé le précipité avec un peu d'eau. Les liquides surnageants réunis sont exactement neutralisés par une solution de chlorure de baryum. Le précipité de phosphotungstate de baryum ainsi obtenu est éliminé par centrifugation puis lavé deux fois avec de l'eau chaude. Les liquides surnageants sont ensuite concentrés au bain-marie bouillant et portés à un volume total de 25 cm³. Sur cette solution correspondant à 375 mg. de caséine pure nous avons effectué le dosage de la phénylalanine.

Prises d'essai	Mg. de phénylalanine dans la prise d'essai
3 cm³	traces indosables
19 cm³	2,2 mg. (correspondant à 285 mg. de caséine)

Dans les 285 mg. de caséine il y a sensiblement 17,1 mg. de phénylalanine (si l'on admet que la caséine contient 6,0 p. 100 de phénylalanine) ; donc la papaïne a libéré $\frac{2,20}{17,1}$ = 12,8 p. 100 de la phénylalanine totale, soit sous forme d'acide aminé libre, soit combiné dans des polypeptides simples non précipitables par le réactif phosphotungstique.

Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Bergmann et Niemann [4] sur l'action de la papaïne sur la fibrine et ceux, plus anciens, mentionnés par Emmerling [11].

II. — Essai d'ioduration de la caséine.

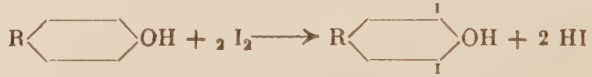
Depuis que l'on sait que la thyréoglobuline tire ses propriétés de la présence d'iode dans sa molécule, de nombreux chercheurs ont essayé de préparer par action de l'iode sur les protéines des produits actifs sur le myxœdème et sur les métamorphoses des batraciens. Cependant les premiers résultats signalés ont été assez contradictoires parce que les composés obtenus étaient mal définis. Par ailleurs, l'hydrolyse de ces protéines iodées fut entreprise dans l'intention de retirer une fraction active et les résultats furent également discordants.

C'est seulement en 1920 que Kendall isola par hydrolyse de la thyréoglobuline la « thyroxine », composé possédant toutes les propriétés thyroïdiennes déjà mentionnées. Récemment Ludwig et Mutzenbecher [27] ont réussi à préparer une caséine iodée contenant 6 à 8 p. 100 d'iode et possédant une activité sur la métamorphose des axolotls ; après hydrolyse barytique de cette protéine ces auteurs parvinrent à isoler la thyroxine cristallisée. Depuis lors, ces résultats ont été confirmés par Harrington et Harris [18].

Par ailleurs, on s'est préoccupé de savoir comment se fixe l'iode sur la molécule protéique et plus spécialement comment se forme la thyroxine. D'après MUTZENBECHER [45], la thyroxine prendrait naissance aux dépens de deux molécules de diiodotyrosine. En effet, la diiodotyrosine dissoute dans de la soude 0,1 N laissée pendant 14 jours à 37° C. conduit à la thyroxine. Cependant HARINGTON et RIVERS [18] font remarquer que la formation de la thyroxine à partir de la diiodotyrosine est difficile à concilier avec notre conception sur la chimie de ces composés.

Nous allons exposer rapidement deux conceptions sur le processus de combinaison de l'iode aux protéines.

D'après CHOH HAO LI, LYONS et EVANS [10] l'ioduration peut être schématisée par l'équation :



où R est le reste de la protéine (*). Ces auteurs ont trouvé que si la protéine absorbe l'iode et si l'iode réagit seulement avec la tyrosine, la proportion de tyrosine diminue parallèlement à l'augmentation de la quantité d'iode fixée et la quantité d'azote de la protéine iodée baisse simultanément. En effet, la proportion d'iode combiné à l'hormone galactogène antéhypophysaire correspond quantitativement à la teneur en tyrosine contenue dans cette protéine en admettant que deux atomes d'iode se fixent à une molécule de tyrosine. En outre, la diminution des valeurs de l'azote correspond également à l'augmentation de la teneur en iode. Les auteurs concluent que l'iode agit dans le cas de l'hormone galactogène uniquement sur le groupe tyrosine. La cinétique de l'ioduration montre d'autre part que certaines molécules de tyrosine de l'hormone réagissent de la même façon que la tyrosine pure tandis que d'autres réagissent plus lentement.

(*) Les protéines iodées ne présentent pas la réaction de MILLON.

Cependant Muus, Coons et Salter [34] étudiant l'ioduration progressive de la sérumalbumine ont trouvé que la quantité d'iode se combinant à la protéine croît à mesure que l'iode est ajouté jusqu'à une quantité maximum, la quantité d'iode fixée étant alors de 15 p. 100. Si l'on ajoute davantage de réactif, non seulement il ne s'en fixe pas davantage, mais encore le produit final a habituellement une teneur en iode plus faible. La quantité d'iode mise en action est dans la plupart des cas sensiblement le double de la quantité combinée ; ce résultat suggère l'idée que la réaction est une substitution plutôt qu'une oxydation. Si la teneur en tyrosine de la sérumalbumine est de 4,65 p. 100 l'iode fixée devrait être de 6,10 p. 100 quand toute la tyrosine et seulement la tyrosine a été iodée, *quantité qui est environ la moitié de celle fixée.* Si l'histidine est aussi iodée complètement, l'iode total devrait être de 10,8 p. 100 ; si on accepte la valeur de 3,4 p. 100 d'histidine dans la sérumalbumine (valeur donnée par Cohn), la teneur en sera inférieure à la quantité combinée (15 p. 100). D'autre part, l'activité thyroïdienne apparaît à 6 p. 100 d'iode et augmente jusqu'à ce que 10 p. 100 soient fixés. Ces résultats permettent de penser que la diiodotyrosine doit être formée avant que l'activité thyroxinienne apparaisse et qu'au moins un atome d'iode doit être ajouté à la molécule protéique pour produire une protéine iodée complètement active, ce qui signifie que la fixation a lieu ailleurs que sur la tyrosine.

Ces deux conceptions contradictoires à savoir dans un cas que seule la tyrosine fixe tout l'iode dans la molécule protéique et que dans l'autre la teneur en iode combiné est de beaucoup supérieure à la quantité de tyrosine nous a conduit à entreprendre une étude sur l'ioduration de la caséine, car on pouvait penser que la phénylalanine participe à la formation de thyroxine dans les conditions de l'expérience, soit par formation intermédiaire de tyrosine, soit par un autre mécanisme.

Tout d'abord nous avons recherché s'il était possible de préparer de la phénylalanine iodée car les résultats sont à cet égard également contradictoires, Furth et Schwartz [17] pensent l'avoir obtenue alors que Oswald [36] n'y serait pas parvenu. Nous avons ensuite comparé les variations des taux de la phénylalanine et de la tyrosine avant et après action de l'iode sur la caséine.

Essai de préparation de phénylalanine iodée. — Nous avons essayé d'obtenir un dérivé iodé de la phénylalanine en nous plaçant dans des conditions d'ioduration analogues à celles décrites par Mutzenbecher [45] à propos de l'ioduration de la caséine.

Voici la technique utilisée :

2 grammes de phénylalanine pure sont dissous dans 70 cm^3 d'ammoniaque à 5 p. 100. Dans cette solution glacée nous avons fait tomber goutte à goutte 20 cm^3 d'une solution aqueuse renfermant 0,60 g. d'iode et 1,20 g. d'iodure de potassium.

Après quelques gouttes la coloration jaune de l'iode persiste dans le milieu ; elle fonce de plus en plus. Il se forme par ailleurs un précipité dû à de l'iodure d'azote. En fin d'opération nous sommes passés en milieu légèrement acide par SO_4H_2 4 N et nous avons extrait l'iode par le sulfure de carbone. Après concentration au bain-marie, nouvelles extractions par le sulfure de carbone. On repasse ensuite en milieu à peine alcalin par une solution de baryte. On chasse l'ammoniac au bain-marie sous le vide en maintenant le pH à 8,2 par de la baryte. On repasse ensuite en milieu acide par une solution SO_4H_2 4 N. On centrifuge, les liquides surnageants sont conservés, on lave plusieurs fois le culot de centrifugation par de l'eau bouillante. On réunit les eaux de lavage. On évapore sous vide, il reste un résidu jaunâtre qu'on reprend par de l'eau. On extrait à nouveau par du sulfure de carbone ; on évapore ensuite sous le vide. Après l'avoir placée dans

un dessicateur à chlorure de calcium on obtient ainsi une poudre colorée en jaune clair contenant encore 13 p. 100 d'humidité. On en retire ainsi 3,80 g. (*).

Sur cette poudre nous avons déterminé l'azote total et l'azote ammoniacal :

Azote total : 4,12 p. 100

Azote ammoniacal : 0,048 p. 100

soit sensiblement 4,07 p. 100 d'azote aminé.

Puisque la phénylalanine pure contient 8,49 p. 100 d'azote la teneur en azote du composé ainsi obtenu correspondrait à $\frac{4,07}{8,49} \times 100 = 47,8$ p. 100 de phénylalanine.

Nous avons dosé, d'autre part, la phénylalanine de ce produit ; nous avons dissous 108 mg. dans 50 cm³ d'eau distillée et effectué des prises d'essai de 2 et 3 cm³.

Prises d'essai	Lectures S_{53}	Correspondance en mg. phénylalanine	Phénylalanine p. 100	Phénylalanine dans 3,8 g. du produit
—	—	—	—	—
2 cm³	0,52	1,94	44,40	1,68
3 cm³	0,76	2,86		

Après action de l'iode sur 2 g. de phénylalanine pure nous avons obtenu 3,8 g. d'un composé comprenant 1,68 g. de cet acide aminé ce qui correspond à une perte de 0,32 g. vraisemblablement dûe aux diverses manipulations effectuées pour obtenir un produit exempt d'iode libre et d'ammoniaque. Par ailleurs, l'azote total du composé représenterait théoriquement une teneur en phénylalanine de 47,8 p. 100 ; comme nous en avons effectivement trouvé 44,4 p. 100 nous pourrions admettre qu'une très faible proportion de la phénylalanine a subi des modifications au cours de l'ioduration ; toutefois, étant données les petites différences constatées, il

(*) Il faut noter que l'iodure de potassium n'a pas été éliminé et que ce composé contient par conséquent des cendres.

se peut que ce léger excès provienne de l'action de l'iode sur l'ammoniaque et non sur l'acide aminé.

Etude analytique de l'action de l'iode sur la phénylalanine et divers acides aminés. — Au lieu d'isoler le produit obtenu après essai d'ioduration de la phénylalanine nous avons recherché par la suite si l'iode se combinait à l'aminoacide en dosant l'excès de ce réactif.

Nous avons adopté le mode opératoire suivant :

Nous avons dissous 500 mg. de phénylalanine pure dans 5 cm^3 d'ammoniaque à 5 p. 100 puis nous avons fait tomber goutte à goutte dans cette solution, refroidie au bain de glace, 5 cm^3 d'une solution d'iode environ N/5. Après être passé en milieu acide par SO_4H_2 2 N nous avons titré l'excès de réactif au moyen d'hyposulfite N/10. Nous en avons versé 12,0 cm^3.

D'autre part nous avons fait un témoin comprenant tous les réactifs à l'exception de l'aminoacide. Nous avons versé 12,1 cm^3 d'hyposulfite N/10. La différence de 0,1 cm^3 entre le témoin et l'essai étant négligeable, nous avons ainsi confirmé le résultat trouvé précédemment à savoir que l'iode ne réagissait pas sur la phénylalanine dans les conditions d'ioduration où nous nous sommes placés.

Par ailleurs, nous avons repris sur différents acides aminés la méthode de détermination de la quantité d'iode réagissante. Nous avons réuni dans le tableau V les résultats de nos dosages.

Les données rassemblées dans ce tableau montrent que la phénylalanine, la proline, la cystine, l'arginine et la sérine ne fixent pas d'iode sur leur molécule tandis que la tyrosine, l'histidine et le tryptophane forment des composés avec ce réactif.

Nous avons étudié plus spécialement l'action de l'iode en milieu ammoniacal sur la cystéine. Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'une molécule de cystéine réagit avec une quantité d'iode variant avec la

concentration du réactif et de l'aminoacide.Il en faut en général de 3 à 4 atomes par molécule de cystéine. La réaction est vraisemblablement une réaction d'oxydation produisant dans certains cas une sulfinone de la cystéine, mais les conditions pour obtenir ce composé sont difficiles à préciser.

TABLEAU V. — *Action de l'iode sur la phénylalanine et divers acides aminés.*

Acides aminés dissous dans 5 cm³ d'NH_3 à 5 p. 100	Quantités mises en expérience en mg.	Nombre de cm³ d'I N/5 environ ajoutés	Différence des nombres de cm³ d'hyposulfite N/10 versés pour le témoin et l'essai	Nombre d'atomes d'iode réagissant sur une molécule d'acide aminé	Nombre d'atomes d'iode se fixant sur une molécule d'acide aminé
Phénylalanine.....	500	5	0		0
Tyrosine.....	91	10	20,0	3,98 soit 4	2
Proline.....	57	10	0		0
Histidine	50	10	13,5	3,80 — 4	2
Tryptophane.....	50	10	8,65	2,94 — 3	2
Cystine.....	50	10	0,30		0
HCl, cystéine.....	53	10	11,20	2,91 — (3)	0
Arginine.....	101	10	0,70		0
Sérine	100	10	0,10		0

Ainsi, à l'exception de la cystéine dont le groupement fonctionnel —SH est oxydé, la fonction alcool de la sérine et la fonction amine de tous les aminoacides ne sont pas oxydées par l'iode. Plus généralement, il apparaît vraisemblable, en conséquence, que l'ioduration des protéines conduit surtout à une réaction de substitution plutôt qu'à une oxydation des molécules protéiques.

Préparation de la caséine iodée. — L'iode ne réagissant pas sur la phénylalanine pure, dans les conditions précisées précédemment, nous avons étudié si, dans les mêmes conditions, la position de la phénylalanine dans la molécule protéique ne conférait pas à certains *H* de cet aminoacide une mobilité particulière sus-

ceptible de donner des composés avec ce réactif. Nous avons préparé pour cela une caséine iodée et déterminé la teneur en phénylalanine de cette protéine en la comparant à celle obtenue sur la caséine pure ; parallèlement nous avons déterminé les variations des taux de la tyrosine avant et après ioduration.

Voici la technique d'ioduration de la caséine utilisée et qui est sensiblement celle décrite par MUTZENBECHER [45] :

Nous avons dissous, en broyant dans un mortier, 5 g. de caséine dégraissée dans 175 cm^3 d'ammoniaque à 5 p. 100. Dans cette solution glacée nous avons versé lentement, et en agitant bien, 50 cm^3 d'une solution aqueuse renfermant 1,5 g. d'iode et 3 g. d'iodure de potassium. Les premières portions d'iode tombant dans la solution ammoniacale de caséine sont immédiatement décolorées, ce qui montre que des réactions se produisent ; puis une coloration jaune apparaît à partir de 40 cm^3 et fonce de plus en plus traduisant ainsi l'excès d'iode. On passe alors en milieu acide par SO_4H_2 4 N ; un précipité se forme. L'excès d'iode est réduit par l'hyposulfite N/10. Le précipité est séparé par centrifugation, puis lavé plusieurs fois à l'eau et chaque fois centrifugé. Il est ensuite redissous dans le moins possible de NaOH N/10 (15 cm^3) puis reprécipité par de l'acide sulfurique dilué. Le précipité est à nouveau isolé par centrifugation, lavé plusieurs fois à l'eau jusqu'à ce que la réaction des sulfates et des iodures soit négative, il est ensuite rapidement lavé à l'alcool, puis à l'éther, enfin séché dans un dessicateur à vide. On obtient 5,70 g. d'une poudre jaune exempte d'iode libre, d'iodure, d'ammoniaque et de cendres.

Nous avons préparé deux échantillons de caséine iodée provenant de caséine dégraissée HOFFMANN LA ROCHE. Sur ces deux produits nous avons déterminé la teneur en azote par kjeldahl :

Echantillon A. — 12,16 p. 100 d'azote, ce qui correspond à $\frac{12,16 \times 100}{15,65} = 77,8$ p. 100 de protéine, étant donné que la caséine pure contient 15,65 p. 100 d'azote.

Echantillon B. — 12,64 p. 100 d'azote soit 80,8 p. 100 de protéine.

D'autre part nous avons dosé l'iode de ces composés par la méthode de Liepert, relevée sur l'ouvrage de Friedrich (*) et dont voici le principe : la substance organique est brûlée dans un tube de perles dans un courant d'oxygène et l'iode élémentaire capté dans une solution saturée de carbonate de soude. L'iode ainsi fixé est oxydé en iodate par de l'eau de brome en solution faiblement acide. Après élimination du brome en excès par entraînement à la vapeur, de l'iodure de potassium est ajouté et l'iode libéré est titré. Le dosage qui porte sur quelques milligrammes de substance est d'une grande précision du fait que la quantité d'iode titrée correspond à six fois la quantité initiale d'iode.

Produit A. — Pesée 7,71 mg. ; versés 4,16 hyposulfite N/100
soit 14,81 d'iode fixé p. 100 de protéine.

Produit B. — Pesée 5,85 mg. ; versés 3,32 hyposulfite N/100
soit 14,96 d'iode fixé p. 100 de protéine.

Sur les produits ainsi analysés nous avons vérifié que la réaction de Millon était négative, puis nous avons déterminé la teneur en phénylalanine et en tyrosine de ces corps après hydrolyse alcaline. Nous avions en effet constaté que SO_4H_2 7 N hydrolyse la protéine en libérant de grandes quantités d'iode, aussi avons-nous adopté l'hydrolyse préconisée par Choh Hao Li, Lyons et Evans [10], à savoir l'hydrolyse alcaline en tube scellé :

98 mg. de caséine Hoffmann Laroche, 97 mg. de caséine iodée (A) et 101 mg. de caséine iodée (B) sont

(*) *La pratique de la microanalyse organique quantitative* par Friedrich (A.). p. 182-84, 1 vol., Dunod Edit., Paris (1939).

mis dans trois petits tubes à essai pyrex, puis après avoir ajouté à chacun 2 cm³ de KOH 5 N nous les avons scellés à la flamme ; nous les avons placés à l'étuve à 100° C. pendant 40 heures. Après refroidissement nous avons versé quantitativement le contenu de chacun de ces tubes dans des ballons jaugés de 15 cm³, puis nous avons ajouté 3 cm³ SO_4H_2 7 N et complété ensuite à 15 cm³ avec de l'eau distillée.

Sur ces hydrolysats nous avons dosé la phénylalanine par la technique que nous avons élaboré et la tyrosine par la méthode de Folin et Marenzi [15]. Nous avons par ailleurs déterminé la teneur en phénylalanine sur ces produits avant hydrolyse.

Voici les résultats obtenus.

TABLEAU VI. — *Résultats de l'ioduration de la caséine.*

	Azote p. 100	Protéine p. 100 azote $\times \frac{100}{15,65}$	Après hydrolyse par KOH 5N		Dosages avant hydrolyse phényl-alanine p. 100 de protéine
			Phényl-alanine p. 100 de protéine	Tyrosine p. 100 de protéine	
Caséine.....	14,35	91,7	5,96	4,44	5,91
Caséine iodée, échantillon A. 14,81 d'iode fixé p. 100 de protéine.....	12,16	77,7	3,02	Traces	2,82
Caséine iodée, échantillon B. 14,96 d'iode fixé p. 100 de protéine.....	12,64	80,8	3,12	Traces	3,06

L'examen des données de ce tableau montre que si l'on effectue de façon identique les opérations d'ioduration sur deux échantillons de caséine, on peut préparer deux corps fixant de l'iode en quantité remarquablement constante, 14,81 p. 100 dans un échantillon et 14,96 p. 100 dans un autre.

En outre, les résultats des dosages de la phénylalanine avant et après ioduration montrent que cet aminoacide se comporte différemment à l'état libre ou combiné. Dans le premier cas l'action de l'iode est pratiquement nulle alors que lorsqu'il fait partie de la molécule protéique il se combine avec ce réactif puisque la teneur de la phénylalanine masquée après ioduration correspond à 50 p. 100 environ de la quantité totale. On peut expliquer cette différence de comportement en admettant que par suite de substitution amidée sur la chaîne alanine de cet aminoacide la mobilité de l'*H* en ortho ou en para par rapport à cette chaîne devient plus grande et que c'est sur cet *H* que se fait la combinaison avec l'iode.

D'autre part, si l'on admet que, par action de ce réactif en milieu ammoniacal sur la protéine, la réaction qui s'opère en premier lieu est la formation de diiodotyrosine, on peut considérer que la constitution de ce composé agit comme catalyseur d'oxydation, de sorte que l'excès de réactif oxyderait l'hydrogène en para par rapport à la chaîne substituée de la phénylalanine en donnant naissance à une fonction phénol créant ainsi une nouvelle molécule de tyrosine, laquelle fixerait à nouveau de l'iode pour donner de la diiodotyrosine. De plus, les positions respectives des molécules de tyrosine et de phénylalanine dans la protéine ne doivent pas être indifférentes à la capacité réactionnelle d'oxydation produite, ce qui expliquerait qu'environ 50 p. 100 de la phénylalanine disparaît après ioduration. Par ailleurs, bien que la formation de tyrosine à partir de la phénylalanine ne soit pas mise en évidence il apparaît que le dérivé iodé de la phénylalanine obtenu après action de l'iode sur la caséine ne doit pas être un composé labile puisqu'il résiste à l'hydrolyse alcaline de la caséine iodée ; on retrouve, en effet, les mêmes résultats — aux erreurs expérimentales près — pour les dosages effectués avant hydrolyse ou sur un hydrolysat. Par ailleurs,

au cours du dosage, la réaction de nitration faisant appel à des réactifs concentrés il est peu probable que les produits obtenus soient de simples composés d'addition d'iode à la phénylalanine de la molécule protéique ; ils ne résisteraient pas, en effet, et nous retrouverions, après les opérations de dosage, les mêmes résultats que pour la caséine pure. En outre, il est peu vraisemblable que le réactif oxyde la chaîne alanine substituée de la phénylalanine présente dans la protéine, mais même si cette réaction avait effectivement lieu elle nous échapperait ; en effet, on obtiendrait après hydrolyse de la caséine iodée des composés constitués par un cycle benzénique ayant comme substitution une chaîne provenant de l'oxydation du reste d'alanine ; or, comme l'ont montré Block et ses collaborateurs, de semblables produits fournissent la même coloration que la phénylalanine pure. Cependant, avant de conclure à l'existence réelle d'un dérivé iodé de la phénylalanine, constitué par de la diiodotyrosine qui se combinerait éventuellement à une autre molécule de diiodotyrosine pour fournir de la thyroxine, d'autres études sont nécessaires et plus particulièrement le dosage de la diiodotyrosine après hydrolyse alacline de la caséine iodée ; en effet, si le taux de diiodotyrosine obtenu ainsi est supérieur à la quantité correspondante de tyrosine de la protéine pure, la démonstration de la formation de tyrosine à partir de la phénylalanine sera faite. Nous poursuivons actuellement nos recherches dans ce sens ; si cette hypothèse n'est pas vérifiée, il nous faudra conclure à l'existence d'un dérivé iodé de la phénylalanine qu'il sera nécessaire d'isoler afin de l'identifier.

Nous avions vérifié que cette protéine ne donnait pas la réaction de Millon ; les déterminations de la tyrosine, sur les hydrolysats alcalins, montrent qu'il n'en reste pratiquement plus de libre après ioduration. Nous confirmons ainsi les résultats obtenus par Choh Hao Li, Lyons et Evans [10], mais nous trouvons que la quan-

tité d'iode fixée à la caséine est beaucoup plus grande que celle que ces auteurs ont combiné à l'hormone galactogène antéhypophysaire.

En conclusion, nous pouvons admettre qu'après action de l'iode sur la caséine — dans les conditions indiquées au cours de ce travail — il s'en fixe environ 15 p. 100 ; ce résultat est à rapprocher de celui obtenu par Muus, Coons et Salter [34] sur la sérumalbumine, puisque ces auteurs ont préparé une sérumalbumine iodée contenant 15 p. 100 de ce réactif. D'autre part, nous apportons une contribution à l'hypothèse formulée par Muus, Coons et Salter à savoir que seule la tyrosine présente dans la protéine pure fixe tout l'iode, ainsi que l'admettent Choh Hao Li, Lyons et Evans, puisque nous avons trouvé que la phénylalanine réagit avec ce réactif. De plus, il semble qu'à la suite des essais d'ioduration de divers acides aminés en solution pure, certains, d'entre eux en fixent également et en particulier le tryptophane et l'histidine. Cependant, d'autres recherches sont nécessaires pour élucider complètement ce problème.

RÉSUMÉ.

1. L'étude systématique des divers temps du dosage de la phénylalanine par la méthode de KAPPELER-ADLER et de sa modification par BLOCK et BOLLING a conduit à l'établissement d'un mode opératoire plus satisfaisant que ceux proposés jusqu'ici et permettant le dosage de cet acide aminé dans une marge de 1 à 4 mg. avec une erreur relative maxima de ± 2,5 p. 100 en solution pure et de ± 5 p. 100 dans les protéines.

2. La méthode proposée peut être également appliquée aux hydrolysats sulfuriques ou potassiques des protéines dans des conditions opératoires bien déterminées, l'adsorption de la phénylalanine à certains agents de décoloration des hydrolysats et la présence d'un excès de tryptophane étant des facteurs de perturbation possibles qu'il convient d'éliminer.

3. La teneur en phénylalanine de la caséine et de quatorze euprotéines (albumines, globulines, histone, protamines, scléroprotéines) et celle de dix-neuf pigments respiratoires (hémoglobines, myoglobine, hémocyanines) ont été déterminées. Dans le cas de ces derniers corps, sa connaissance apporte une nouvelle contribution à l'étude de la spécificité des chromoprotéides respiratoires des diverses espèces et à la différenciation des hémoglobines sanguines et musculaires (myoglobines). En effet, la teneur en phénylalanine de la myoglobine étudiée est plus faible que celle de l'hémoglobine sanguine correspondante, faisant ainsi apparaître une manifestation de la diversité de composition en

acides aminés de ces deux chromoprotéides hématiniques. Par ailleurs, les différences de composition en phénylalanine entre les hémocyanines des crustacés et celles des mollusques sont marquées et suggestives. Le pigment respiratoire des crustacés est plus riche en phénylalanine que celui des mollusques ; quant à l'hémocyanine de la Limule (*Limulus polyphemus*) elle est beaucoup plus pauvre en cet acide aminé que celle des crustacés, contrôlant ainsi la différenciation établie par les zoologistes qui la considèrent aujourd'hui comme un arachnide de type archaïque.

4. Nous avons déterminé la teneur en phénylalanine des tissus musculaires de sept animaux sans trouver une différence nette traduisant une spécificité de composition.

Nous avons étudié la teneur en phénylalanine des protéines totales des cellules hépatiques de rats normaux et chez des sujets en période de jeûne total ou protéique, assez longue pour que l'épuisement des réserves azotées du foie soit atteint. Nous avons trouvé que les protéines de réserves du foie ne peuvent être différenciées de celles constituant le protoplasme actif de cet organe par leur teneur en phénylalanine ; en outre, les résultats de nos expériences montrent que cet acide aminé n'est pas détaché sélectivement, en abondance tout au moins, au cours de la protéolyse cellulaire.

5. Après action prolongée de la pepsine chlorhydrique sur l'édestine nous n'avons pu mettre en évidence la libération de cet acide aminé, alors qu'après action prolongée de la papaïne activée au cyanure de potassium 12,8 p. 100 de la phénylalanine de la caséine sont libérés, soit sous forme d'acide aminé libre, soit combiné dans des polypeptides simples non précipitables par le réactif phosphotungstique.

6. Par action de l'iode sur la phénylalanine pure il ne nous a pas été possible d'obtenir de réaction avec ce

corps ; par contre, sur deux échantillons de caséine iodée, que nous avons préparés et contenant 15 p. 100 environ d'iode, 50 p. 100 environ de la phénylalanine sont masqués. Ce résultat suggère l'hypothèse que la phénylalanine dans la molécule protéique devient plus apte à réagir que la phénylalanine libre et qu'il se formerait un dérivé iodé de la phénylalanine sans doute constitué par de la diiodotyrosine. Ce composé prendrait naissance après ioduration de la tyrosine, aminoacide obtenu intermédiairement par oxydation de la phénylalanine rendue plus apte à réagir du fait du voisinage d'une molécule de diiodotyrosine formée à partir de la tyrosine présente dans la molécule protéique.

En outre, les dosages de tyrosine effectués sur la caséine iodée — après hydrolyse alcaline — indiquent qu'il n'en reste pratiquement plus de libre après ioduration ; cependant, nos résultats montrent que ce n'est pas le seul acide aminé susceptible de fixer l'iode et que vraisemblablement en plus de la phénylalanine, le tryptophane et l'histidine doivent en fixer également.

Marseille, le 18 novembre 1943.

Vu, *le Président*,
JEAN ROCHE.

Vu et approuvé :

Le Doyen,
LUCIEN CORNIL.

Vu et permis d'imprimer :

Aix, le 26 novembre 1943.

Le Recteur,
E. GAU.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Abderhalden (E.). — Weitere Studien über die Einwirkung von Ascorbinsäure bzw. Dehydroascorbinsäure auf Aminosäuren. *Fermentforschung*, 1935, **15**, (4), 522-528.
2. Abderhalden (E.). — Lehrbuch der Physiologischen Chemie, 5e édition. Berlin, Urban et Schwarzenben, édition de 1920, 1re partie, p. 468 et 471.
3. Addis (T.), Poo (L. J.) and Lew (W.). — The quantities of protein lost by the various organs and tissues of the brody during a fast. *Journ. of biol. Chem.*, 1936, **115**, 111-116.
4. Bergmann (M.) and Niemann (C.). — On proteolytic Enzymes. XIV. On the general nature of the enzymatic degradation of proteins. *Journ. of biol. Chem.*, 1937, **118**, 781-788.
5. Block (R. J.). — The determination of the aminoacids. 1 vol., 91 p. Burges publishing Company ed. Mineapolis, p. 75-76.
6. Block (R. J.) and Bolling (D.). — Unpublished experiments. Description détaillée dans [**5**], p. 75.
7. Block (R. J.) and Bolling (D.). — Chemical and metabolic studies on phenylalanine. I. The nitration of phenylalanine. *Journ. of biol. Chem.*, 1939, **129**, 1-12.
8. Block (R. J.), Bolling (D.), Jervis (G. A.) and Webb (M.). — Chemical and metabolic studies on phenylalanine. II. The aminoacid content of tissue proteins of normal and phenylpyruvic oligophrenic individuals. A note on the estimation of phenylalanine. *Journ. of biol. Chem.*, 1940, **134**, 565-572.
9. Calvery (H. O.) and Schock (E. D.). — Cristalline egg albumin. III. Fractionation of peptic hydrolysis products by dialysis. *Journ. of biol. Chem.*, 1936, **113**, 15-19.
10. Choh Hao Li, Lyons (W. R.) and Evans (H. M.). — Studies on pituitary lactogenic hormone. V. Reactions with iodine. *Journ. of biol. Chem.*, 1941, **139**, 43-55.
11. Emmerling (O.). — Ueber die Eiweisspaltung durch Papayotin. *Ber. d. Deutsch. Chem. Ges.*, 1902, **35**, 695-699.

12. Emond (Y). — Protéolyse et dislocation sélective des protéines musculaires et hépatiques au cours du jeûne protéique. Thèse Doct. en Pharmacie, Marseille, 1942, 1 vol. Declume, édit., Lons-le-Saunier.
13. Fischer (E.). — Ueber die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1901, **33**, 151-176.
14. Fischer (E.) und Abderhalden (E.). — Ueber die Verdauung des Caseins durch Pepsinsalzsäure und Pankreasfermente. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1903, **40**, 215-219.
15. Folin (O.) and Marenzi (A. D.). — Tyrosine and Tryptophane determinations in one-tenth gram of protein. *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **83**, 89-102.
16. Fosse (R.), de Graeve (P.) et Thomas (P. E.). — Recherches pour identifier par l'analyse élémentaire de faibles quantités d'acides aminés. *C. R. Acad. Sc.*, 1935, **200**, 272-275.
17. Fürth (O.) und Schwarz (K.). — Ueber die Einvirkung des Jodothyrins auf den Zirkulationsapparat. *Arch. ges. Physiol. Bonn*, 1908, **124**, 113-156.
18. Harington (C. R.) and Rivers (R. V. P.). — Preparation of Thyroxine form Casein treated with Iodine. *Nature*, 1939, **144**, 205.
19. Jensen (H.) and Evans (E. A.). — Studies on crystalline insulin. XVIII. The nature of the free aminogroups in insulin and the isolation of phenylalanine and proline from crystalline insulin. *Journ. of biol. Chem.*, 1935, **108**, 1-9.
20. Jervis (G. A.), Block (R. J.), Bolling (D.) and Kanze (E.). — Chemical and metabolic studies on phenylalanine. II. The phenylalanine content of the blood and spinal fluid in phenylpyruvic oligophrenia. *Journ. of biol. Chem.*, 1940, **134**, 105-113.
21. Jochem (E.). — Ein einfaches Verfahren zur Ueberführung der Amidofettsäuren in die entsprechenden Monochlorfettsäuren. *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1900, **31**, 119-131.
22. Kappeler-Adler (R.). — Ueber eine neue Reaktion zur qualitativen und quantitativen Bestimmung des Phenylalanins. *Biochem. Ztschr.*, 1932, **252**, 184-200.
23. Kollmann (G.). — Versuche zur Bestimmung des Phenylalanins auf oxydativen Wege. *Biochem. Ztschr.*, 1928, **194**, 1-14.
24. Kuhn (R.). und Desnuelle (P.). — Ueber die Aminosäuren des gelben Ferments. *Ber. d. Deutsch. Chem. Ges.*, 1937, **70**, 1907-1926.
25. Kuhn (R.) und Weygand (F.). — *O*- und *p*- Nitrophenylhydroxylamin. *Ber. d. Deutsch. Chem. Ges.*, 1936, **69**, 1969-1974.
26. Luck (J. M.). — The liver proteins, p. 215-229. In Pers-

pectives in Biochemistry, 1 vol., Cambridge Univ. press, édit., 1937.
27. Ludwig (W.) und von Mutzenbecher (P.). — Die Darstellung von Thyroxin, Monojodtyrosin und Dijodtyrosin aus jodiertem Eiweiss. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1939, **258**, 195-211.
28. Meisenheimer (J.). — Zur Reduktion der Dinitrobenzole. *Ber. d. Deutsch. Chem. Ges.*, 1903, **36**, 4174-4177.
29. Meisenheimer (J.) und Hesse (E.). — Ueber die Reduktion der O. und p. Dinitro-toluole. *Ber d. Deutsch. Chem. Ges.*, 1919, **52**, 1161-1177.
30. Meisenheimer (J.) und Patzig (E.). — Ueber die Reduction aromatischer o. und p. Dinitroverbindungen. *Ber. d. Deutsch. Chem. Ges.*, 1906, **39**, 2526-2532.
31. Miller (F. M.) and Lyons (R. E.). — Color reactions of amino acids with phenol and hypochlorites including new tests for tryptophan and phenylalanin. *Proc. Indiana Acad. Sc.*, 1934, **43**, 132-135.
32. Mörner (C. Th.). — Ueber aus Proteinstoffen bei tiefgriefender Spaltung mit Salpetersäure erhaltene verbindungen. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1915, **95**, 263-309.
33. Moss (A. R.) and Schoenheimer (R.). — The conversion of phenylalanine to tyrosine in normal rats. *Journ. of biol. Chem.*, 1940, **135**, 415-429.
34. Muus (J.), Coons (A. H.) and Salter (W. T.). — Thyroidal activity of iodinated serum albumin. IV. The effect of progressive iodination. *Journ. of biol. Chem.*, 1941, **139**, 135-144.
35. Northrop (J. H.). — Crystalline pepsin. I. Isolation and tests of purity. *Journ. of Gen. Physiol.*, 1930, **13**, 739-766. — II. General properties and experimental methods. *Journ. of Gen. Physiol.*, 1930, **13**, 767-780.
36. Oswald (A.). — Beitrag zur Kenntnis der Einführung von Jod in den Benzolring. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1909, **58**, 290-294.
37. Roche (A.). — La plasticité des protéines et la spécificité de leurs caractères. Actualités scientifiques et industrielles, série, Exposé de Biophysique, 1935, 1 vol. Hermann et Cie, édit., Paris.
38. Roche (A.). — Inanition protéique. Réserves azotées et constitution des protéines musculaires. Thèse. Doct. Méd., Marseille, 1933, 1 vol. Patissier, édit., Trévoux.
39. Roche (J.), Drouineau (S.), Fouquet (S.) et Passelaigue (P.). — Réparation des pertes azotées importantes et couverture des besoins alimentaires en protides. II. Sur la participation des divers organes aux pertes azotées et à leurs réparations et sur le rôle physiologique de l'azote extractif des tissus. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 720-749.

40. Roche (J.). — Essai sur la biochimie générale et comparée des pigments respiratoires, 1 vol., 20 p. Masson et Cie, édit., Paris, 1936.
41. Roche (J.), Derrien (Y.) et Vieil (H.). — Recherches sur la composition et la spécificité des myoglobines (hémoglobines musculaires). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1016-1026.
42. Salaskin (S.) und Kowalevsky (K.). — Ueber die Wirkung des reinen Hundemagensaftes auf das Hämoglobin, resp. Globin. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1903, **38**, 567-584.
43. Schulze (E.) und Barbieri (J.). — Ueber das Vorkommen von Phenylamidopropionsäure unter den Zersetzungsprodukten der Eiweissstoffe. *Ber. d. Deutsch. Chem. ges.*, 1881, **14**, 1785-1791.
44. Vickery (H. B.). — The rate of hydrolysis of wheat gliadin. *Journ. of biol. Chem.*, 1922, **53**, 495-511.
45. Von Mutzenbecher (P.). — Ueber die Bildung von Tyroxin aus Dijodtyrosin. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1939, **261**, 253-256.

TABLE DES MATIÈRES.

PREMIÈRE PARTIE.

Introduction 9

I. — Préparations à partir des germes de *Lupinus luteus* 10

II. — Préparations à partir des hydrolysats de protéines 10

III. — Propriétés physiques 11

IV. — Propriétés chimiques 12

a. Dégradation par chauffage 12

b. Oxydation 12

c. Réactions dûes à l'existence du cycle benzénique 13

d. Réactions de précipitation 14

e. Réactions colorées et d'identification.... 14

V. — Procédés de dosage 19

A. Anciens procédés 19

1° Dosage de FISCHER..... 19

2° Dosage de KOLLMANN 21

B. Dosages colorimétriques 21

1° Méthode de KAPPELER-ADLER 21

2° Modifications apportées à la méthode de KAPPELER-ADLER 23

a. Technique de KUHN et DESNUELLE. 23

b. Technique de BLOCK et BOLLING.. 24

Objet du travail 27

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles 31

CHAPITRE I.

Recherches sur le dosage de la phénylalanine..... 33

Préparation de phénylalanine pure..... 33

I. — Dosage de la phénylalanine en solution pure 34

a. Par la technique de Block et Bolling.. 34

b. Technique préconisée. — Modifications apportées à la méthode de Kappeler-Adler (courbe étalon) 34

II. — Etude du dosage du la phénylalanine dans un mélange d'acides aminés 37

III. — Dosage de la phénylalanine dans les hydrolysats de caséine 40

Etude de la décoloration au noir animal.. 41

Décoloration au moyen du talc 42

Décoloration des hydrolysats sulfuriques par neutralisation à la baryte 43

Hydrolysat sulfurique de caséine 45

Etude de l'hydrolyse alcaline de la caséine. 46

Hydrolyse chlorhydrique de la caséine.... 47

Hydrolyse phosphorique de la caséine.... 48

IV. — Dosage de la phénylalanine dans la caséine avant hydrolyse 49

Tableau I. — Valeur comparée de divers agents d'hydrolyse pour le dosage de la phénylalanine dans la caséine 50

Chapitre II.

Application du dosage à des protéines pures et à des tissus 53

A. — Teneur en phénylalanine des protéines... 53

Tableau II. — Teneur en phénylalanine de diverses protéines 54

B. — Teneur en phénylalanine des tissus protéiques 56

Tableau III. — Teneur en phénylalanine de tissus protéiques 56

C. — Teneur en phénylalanine de protéines hépatiques de rats normaux et d'inanitiés protéiques 57

Tableau IV. — Teneur en phénylalanine des protéines hépatiques de rats 59

Position et réactivité de la phénylalanine dans les molécules protéiques 61

I. — Essai de libération de la phénylalanine par les ferments protéolytiques 62

a. Essai de libération par la pepsine chlorhydrique 63

b. Essai de libération par la papaïne 64

II. — Essai d'ioduration de la caséine 65
Essai de préparation de phénylalanine iodée 68
Etude analytique de l'action de l'iode sur la phénylalanine et divers acides aminés. 70
Tableau V. — Action de l'iode sur la phénylalanine et divers acides aminés..... 71
Préparation de la caséine iodée 71
Tableau VI. — Résultats de l'ioduration de la caséine 74

Résumé 79

Bibliographie 83

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

Actions activatrices et inhibitrices des métaux sur les enzymes

---

M. Declume, Imp. Lons-le-S. (C. O. L. 31.2160)-3.108, février 1944
Dépôt légal 1er trimestre 1944 — N° 3544.